

**Universidade Federal do Paraná**

**Maria Fernanda Rodrigues de Paula**

**Participação vagal nos fenômenos das respostas  
inflamatória e de fase aguda**

Monografia apresentada à disciplina de  
Estágio EM (BT020) do Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná para obtenção do  
Grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas.

**Orientador: Prof Dr. Aleksander Roberto Zampronio**

**Curitiba**

**2000**

*Dedico esta monografia à minha família: Pai, Mãe, Ico, Mari e Marcelo, pelo apoio e compreensão que foram essenciais para a realização deste trabalho.*

### **Ao meu orientador e amigo Aleks**

Foi uma sorte ter você como meu orientador, pois a oportunidade de desenvolver este trabalho possibilitou-me aprender muito, através das pesquisas e discussões sobre inflamação. Os “puxões de orelha” foram essenciais para me fazer entender e aprender a trabalhar melhor. Obrigada pelo estímulo, incentivo e confiança.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aqueles que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

- Aos meus pais, Pedro e Anésia, pelo carinho e incentivo durante toda a minha graduação, e as minhas irmãs Carolina e Marinez, que apesar das briguinhas, sempre estiveram do meu lado;

- Marcelo, meu querido amigo e namorado, seu incentivo, confiança e amor constante me confortaram em todos os momentos de alegria e cansaço. Além disso, você me mostrou a importância de nunca desistir dos meus sonhos!!!

- À super amiga Cristina, companheira na biologia e na farmacologia, pela ajuda e apoio nessa nova fase e pela nossa sólida amizade, capaz de superar todas as dificuldades encontradas durante esses 5 anos de convivência;

- À família Werner: Sr. Marcílio, D. Iolanda, Mônica e Danielle, pela acolhida em sua casa, pelo carinho e pela amizade sincera conquistada nesses anos de convivência;

- Às professoras Dras. Berenice e Ana Maria, pela ajuda em todas as minhas dúvidas sobre inflamação e pela amizade e carinho que marcaram estes anos de convivência;

- À Profa. Dra. Maria Consuelo, pela minha iniciação na farmacologia e pelos meus primeiros trabalhos científicos, que marcaram para sempre o rumo da minha carreira científica;

- À Profa. Dra. Lia, pela amizade constante e por me fazer entender a importância de saber “andar com as próprias pernas” nessa carreira;

- Aos companheiros de experimento Daniel Fraga, pela ajuda na “difícil arte de vagotomizar”, Nicolle e Maureen, valeu contar com vocês!

- Às amigas inflamadas Mani, Fabi, Joice e Lú, que me ensinaram a dar os primeiros passos no laboratório, além da divertida convivência nos corredores da farmaco....

- Às funcionárias do departamento de farmacologia: Sílvia, Nair e Lindacir, pelo apoio técnico e amizade;

- Aos funcionários do Biotério Cândido, Donizetti e D. Tereza, por sempre darem um jeitinho em arrumar os ratinhos gordinhos para os meus experimentos.

- Aos funcionários Paulo Henrique e Acir, responsáveis pela manutenção dos computadores, sempre cheios de vírus nas horas mais impróprias;

- À Rô, bióloga e secretária, pela disposição em ajudar com os problemas durante o curso, bem como pela sua amizade e carinho;

- Aos amigos biólogos Fábio (Queixo), Ingo e Marília, pelo convívio agradável e amizade especial desde o ingresso na biologia, vocês vão deixar saudades!

- Às minhas amigas Mônica, Mayra e Giselle, companheiras de "margaritas e outras cositas mas", por contar com vocês durante todos estes anos quando era necessário dar uma descansadinha, sempre ouvindo minhas histórias da farmacologia.....

- Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;

À DEUS, que acompanhou e iluminou meu caminho, dando toda a força necessária;

**de coração,  
muito obrigada!!!**

## ÍNDICE

RESUMO.....	i
1 . INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - Inflamação como resposta de defesa.....	02
1.2 - A migração leucocitária durante a resposta inflamatória.....	04
1.3 - A leucocitose.....	07
1.4 - A resposta febril.....	08
2 . OBJETIVOS.....	18
2.1 - Objetivo Geral.....	19
2.2 - Objetivos Específicos.....	20
3 . MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 – Materiais.....	22
3.1.1 - <i>Animais</i> .....	22
3.1.2 - <i>Drogas</i> .....	22
3.1.3 - <i>Soluções</i> .....	22
3.1.4 - <i>Esterilização</i> .....	23
3.2 – Métodos.....	23
3.2.1 - <i>Vagotomia subdiafragmática</i> .....	23
3.2.2 - <i>Determinação da variação da temperatura corporal</i> .....	24
3.2.3 - <i>Coleta de sangue e do fluido inflamatório da cavidade peritoneal</i> .....	24
3.2.4 - <i>Contagem total e diferencial de leucócitos no fluido peritoneal e sangue</i> .....	25
3.2.5 - <i>Avaliação de células residentes na cavidade peritoneal</i> .....	25
3.2.6 - <i>Avaliação do peso dos estômagos de animais falso-operados e VGX</i> .....	26
3.2.7 - <i>Análise estatística</i> .....	26

<b>4. RESULTADOS</b>	27
4.1 - Curva dose resposta do LPS na migração de leucócitos	28
4.2 - Curva dose resposta do LPS na leucocitose	31
4.3 - Curva dose resposta do LPS na resposta febril	34
4.4 - Avaliação do tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue	36
4.5 - Peso dos estômagos de animais VGX e falso-operados	42
4.6 - Resposta febril induzida por LPS em ratos VGX	43
4.7 - Avaliação de células residentes na cavidade peritoneal	46
4.8 - Avaliação da migração leucocitária em ratos VGX	49
4.9 - Avaliação da leucocitose em ratos VGX	51
<b>5. DISCUSSÃO</b>	53
<b>6. CONCLUSÃO</b>	64
<b>7. APÊNDICE</b>	67
7.1 - Apêndice 1	67
7.2 - Apêndice 2	69
7.2.1) <i>Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 1,5 hora</i>	69
7.2.2) <i>Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 3 horas</i>	70
7.2.3) <i>Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 6 horas</i>	71
7.2.4) <i>Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 3 horas (VGX)</i>	73
7.2.5) <i>Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 6 horas (VGX)</i>	74
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76

---

Neste estudo, correlacionamos os fenômenos da RI (reação inflamatória), representado pela migração leucocitária, com os da RFA (reação de fase aguda), representados pela leucocitose e resposta febril, utilizando LPS - ip em ratos Wistar normais e vagotomizados (VGX). Na 6ª hora, em animais normais, o número de leucócitos totais e neutrófilos para a cavidade peritoneal aumentou nas doses de 0.002 a 2 µg/kg (pico 0.2 µg/kg) de LPS e diminuiu nas doses de 20.0 e 200.0 µg/kg. LPS induziu leucocitose dose-dependente, caracterizada por neutrofilia (pico 200.0 µg/kg). A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal aumentou 1,5 e 3 horas após o LPS 0.2 µg/kg. LPS promoveu neutrofilia tempo-dependente a partir da 3ª hora. Animais VGX apresentaram uma redução de 50% de leucócitos mononucleares residentes, comparado ao grupo falso-operado. Nestes animais VGX, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, induzida pelo LPS 0.2 µg/kg, foi significativamente reduzida quando comparada ao grupo falso-operado. No entanto, a vagotomia subdiafragmática não promoveu variações na leucocitose e neutrofilia, quando da administração do LPS 200.0 µg/kg. A temperatura retal dos animais foi avaliada a cada 30 minutos por 6 horas após a injeção dos estímulos pirogênicos. As duas doses de LPS induziram febre em ratos normais, sendo mais evidente a dose de 200.0 µg/kg a partir da 2,5 hora. Animais VGX que receberam as duas doses de LPS não apresentaram elevação da temperatura corporal, quando comparados aos respectivos grupos falso-operados. A redução da migração de neutrófilos (LPS 200.0 µg/kg na 6ª hora) seguida de leucocitose indica que as células de defesa respondem aos mediadores inflamatórios migrando para o sítio inflamatório ou permanecendo no sangue. Além disso, a migração de neutrófilos pode ser observada a partir de 1,5 hora após o LPS, enquanto que a leucocitose (neutrofilia) e a resposta febril começam a ser detectadas 3 horas após a administração dos estímulos. Sugerimos, através da diminuição da migração leucocitária, que o nervo vago é importante na comunicação entre o sistema fagocitário mononuclear e o SNC. Além disso, concluímos também que o nervo vago constitui uma importante via de comunicação entre elementos do sistema imune (durante a RFA) com o sistema nervoso, uma vez que animais VGX não apresentam febre quando o estímulo é administrado no local desnervado.

---



# 1. INTRODUÇÃO

## **1.1 Inflamação como resposta de defesa**

A inflamação constitui uma resposta de defesa inata do organismo, das mais importantes, uma vez que é essencial para a perpetuação da vida animal.

O interesse pelo fenômeno da reação inflamatória existe desde a antiguidade, e dentre os filósofos que procuraram entender este processo, destacou-se o físico romano Celsus, que definiu os sinais e sintomas da inflamação como rubor, calor, tumor e dor (ROBBINS, 1996).

Durante muito tempo, a reação inflamatória foi considerada uma doença sem distinção entre a causa (trauma) e o efeito (sinais). Contudo, no século XIX, com a evolução da microscopia, HUNTER (1794) descreveu os eventos básicos de uma reação inflamatória como sendo independentes do tipo de trauma que atuasse sobre um tecido, uma vez que as estruturas celulares que participam da resposta inflamatória são sempre as mesmas. Estas estruturas correspondem ao tecido, sangue e microcirculação.

Em 1871, VIRCHOW descreveu o quinto componente clássico da reação inflamatória, representado pela perda de função de um tecido ou órgão, que pode surgir devido à ineficiência da remoção do estímulo injuriante ou ainda decorrente de uma resposta regenerativa inadequada (ROBBINS, 1996).

A reação inflamatória aguda caracteriza-se por ser uma resposta localizada, com caráter essencialmente protetor, induzida por uma infecção microbiana e/ou injúria tecidual, objetivando restaurar a homeostasia do tecido injuriado, através da diluição, destruição ou isolamento do patógeno invasor (revisado por GALLIN e cols., 1992; CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993). O organismo possui diversos agentes pró-inflamatórios que desencadeiam e direcionam o processo, além de agentes anti-inflamatórios que conferem proteção contra uma inflamação desnecessária, bem como promovem a finalização do processo (KUBES, 1993).

Os eventos básicos desencadeados frente as respostas inflamatórias são representados pelo trauma (de origem mecânica, térmica ou química) que ocasiona injúria de células locais (mastócitos, células endoteliais e macrófagos) e migratórias (polimorfonucleares). Microscopicamente, é possível observar uma série de eventos,

como dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, acompanhado do aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo; exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e finalmente, a migração de leucócitos para o foco inflamatório (GALLIN e cols., 1992).

A inflamação é iniciada e rapidamente amplificada e controlada por mediadores de origem plasmática (sistemas das cininas e do complemento; cascatas fibrinolítica e de coagulação) e celular (histamina, eicosanóides, fator de ativação plaquetária, neuropeptídeos, óxido nítrico e citocinas), que são formados e liberados quando da ativação das células fagocíticas e endoteliais. Esta resposta local pode ser considerada benigna quando o processo inflamatório é regulado apropriadamente para manter células e mediadores específicos restritos ao sítio inflamatório (DAVIES e HAGEN, 1997).

Durante o processo inflamatório local, à medida em que ocorre um aumento na quantidade dos mediadores gerados, estes podem adentrar a circulação sanguínea, levando a uma série de fenômenos sistêmicos coletivamente chamados de reação de fase aguda (RFA). Dentre estes fenômenos podemos incluir febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose (neutrofilia), ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas e das concentrações de metais séricos como ferro, cobre e zinco (revisado por STADNYK e GAULDIE, 1991).

BONE (1996) propôs que existem três estágios no desenvolvimento da resposta inflamatória. Em um primeiro estágio, em resposta a um estímulo inflamatório, são produzidas citocinas (no local da injúria), destinadas a iniciar a resposta inflamatória, promovendo reparo e recrutamento de células do retículo endotelial. No segundo estágio, pequenas quantidades de citocinas são liberadas na circulação sanguínea para amplificar a resposta local. Macrófagos e plaquetas são recrutados e a produção de fatores de crescimento é estimulada. O início da reação de fase aguda, representada pelo terceiro estágio, é fortemente controlado pelo simultâneo decréscimo de mediadores pró-inflamatórios e pela liberação de antagonistas endógenos. Estes mediadores liberados no início da resposta inflamatória controlam tanto a "down-regulation" da produção de citocinas quanto a intensidade dos efeitos das citocinas já liberadas. A continuidade deste processo

permite que a intensidade do processo inflamatório seja controlada e a homeostase do organismo seja restituída (DAVIES e HAGEN, 1997).

Em nossos estudos, dedicamos atenção especial ao entendimento de fenômenos relacionados à migração leucocitária, leucocitose (neutrofilia) e resposta febril.

## **1.2 A migração leucocitária durante a resposta inflamatória**

Um dos eventos mais importantes durante a resposta inflamatória é a migração de neutrófilos e, posteriormente, outras células do sangue para os tecidos através de pequenos vasos, promovendo a resposta de defesa do organismo contra patógenos invasores (GRANT, 1973; HURLEY, 1983). Esse processo é mediado por citocinas e quimiocinas, que transmitem os sinais para direcionar os movimentos dos leucócitos durante a inflamação nos tecidos (LUSTER, 1998).

Endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS), extraído de parede celular de bactérias Gram-negativas, é amplamente utilizado para induzir experimentalmente infecções bacterianas promovidas por estes patógenos, uma vez que pode promover a liberação de diversos mediadores inflamatórios tanto *in vivo* como *em vitro*, com conseqüente alterações patofisiológicas no organismo (HEWETT e cols., 1993). A injeção sistêmica de LPS é acompanhada do aumento de citocinas bioativas circulatórias e do decréscimo da produção de citocinas no sítio inflamatório (LUHESHI e cols., 1996). Vários fatores podem influenciar nos fenômenos promovidos pelo LPS, tais como a espécie animal utilizada (McCUSKEY e cols., 1984), tempo de exposição (JACOBSON e FARRAR, 1963; ELLIOT e cols., 1991) e a via de administração (D'ORIO e cols., 1987).

FERREIRA (1980) propôs que os macrófagos residentes funcionam como células de alarme, pois são capazes de estimular a migração de neutrófilos para o foco inflamatório. Além disso, essas células residentes ocupam papel central na defesa contra patógenos invasores através dos mecanismos de fagocitose, apresentação de antígenos e produção de citocinas (SOUZA e cols., 1985).

Macrófagos são capazes de sintetizar substâncias quimiotáticas, tais como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>; MACMILLIAN e FOSTER, 1988), interleucina-1 (IL-1; CYBULSKY e cols., 1986), fator de necrose tumoral (TNF; DINARELLO e cols., 1986), interleucina-8 (IL-8; RIBEIRO e cols., 1991; SMITH e cols., 1991), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ; RIBEIRO e cols., 1990), fator quimiotático para neutrófilos derivado de macrófagos (MNCF, SOUZA e FERREIRA, 1985; CUNHA e FERREIRA, 1986; CUNHA e cols., 1986; DIAS-BARUFFI e cols., 1993) dentre outros.

Os neutrófilos são os únicos leucócitos circulantes que não podem extravasar sem um estímulo inflamatório. No entanto, quando este ocorre, são as primeiras células a migrarem devido a forte interação com o endotélio e maior velocidade de migração (PERRETI, 1997). Posteriormente, monócitos saem da corrente sanguínea e migram para os tecidos, transformando-se em macrófagos, e os eosinófilos são leucócitos característicos de reações mediadas pela imunoglobulina E (IgE) ou ainda por infecções parasitárias. As células circulantes correspondem aos neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos e plaquetas, e as células relativas ao tecido conjuntivo são os mastócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos residentes (ROBBINS, 1996).

O processo de adesão dos leucócitos ao endotélio, ativação e migração leucocitária propriamente dita envolve uma interação entre moléculas de adesão, ativação de leucócitos e atividade de citocinas locais (LEY, 1992; BUTCHER, 1991; SPRINGER, 1994), sendo que a seqüência do processo parece essencial para o eficiente recrutamento de leucócitos aos sítios inflamatórios (BUTCHER, 1991; LAWRENCE e SPRINGER, 1991; VON ADRIAN e cols., 1991; LINDBOM e cols., 1992; ALBELDA e cols., 1994; GRANGER e KUBES, 1994). A interação adesiva entre leucócitos e células endoteliais é mediada pela expressão de moléculas de adesão, encontradas em ambas superfícies celulares, sendo reguladas por uma variedade de mediadores inflamatórios e eventos moleculares que induzem alterações morfológicas, resultando na adesão e então, facilitando a passagem dos leucócitos através das paredes dos vasos. Portanto, a combinação entre a expressão de moléculas de adesão (promovida por uma série de mediadores quimiotáticos indiretos, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e o gradiente de concentrações dos mediadores envolvidos na migração (IL-8 e LTB<sub>4</sub> por exemplo, que são

quimiotáticos diretos para neutrófilos) é que orientam o processo de migração de leucócitos para o sítio inflamatório (HARLAN, 1985; WILKINSON, 1994).

Primeiramente, à medida que o fluxo sanguíneo fica mais lento, devido a vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular, os leucócitos são atraídos para a periferia dos vasos, margeando a superfície endotelial. Posteriormente, esses leucócitos rolam sobre o endotélio, processo este mediado por uma classe de moléculas de adesão denominadas selectinas, expressas tanto em neutrófilos (L-selectinas/ "leukocyte adhesion molecule" : LAM-1) como em células endoteliais (E-selectinas/ "endothelial cell leucocyte adhesion molecule" : ELAM-1 e P-selectinas/ GMP140, receptor de superfície que liga preferencialmente plaquetas) (KISHIMOTO e cols., 1989; LARSON e SPRINGER, 1990; ALBELDA e BUCK, 1990; CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993; ALBELDA e cols., 1994; MULLER, 1995). No entanto, esta interação entre os leucócitos e estas moléculas de adesão não é forte o suficiente para permitir o extravasamento celular. A adesão firme ao endotélio requer a ativação de membros da família das integrinas leucocitárias (LFA-1 : "lymphocyte function-associated antigen-1" ; MAC-1 "macrophage antigen-1" e gp150,95) nos leucócitos e (ICAM-1 "intercellular adhesion molecule-1" e ICAM-2 "intercellular adhesion molecule-2") na superfície das células endoteliais (KISHIMOTO e cols., 1989; LARSON e SPRINGER, 1990; ALBELDA e BUCK, 1990; CRONSTEIN e WEISSMANN, 1993; ALBELDA e cols., 1994; MULLER, 1995).

Esta seqüência de eventos é finalizada pela migração dos leucócitos aderidos por entre as células endoteliais (CARLOS e HARLAN, 1994). Então, tendo migrado para o endotélio, alguns leucócitos podem atravessar imediatamente a membrana basal, ou ainda, permanecer um certo tempo entre o endotélio e a lâmina, devido a continuidade dessa estrutura. Contudo, os leucócitos terminam de transpor a lâmina basal, degradando-a, através da secreção de collagenases. Após o extravasamento, as células migram para o sítio inflamatório, orientadas por um gradiente quimiotático (CARLOS e HARLAN, 1994).

Estes fatores demonstram que a migração leucocitária é um processo multimediado, no qual vários mediadores liberados no foco inflamatório regulam o extravasamento de neutrófilos e demais leucócitos.

### 1.3 A Leucocitose

Endotoxina, quando liberada na corrente sangüínea de mamíferos, pode induzir potentes efeitos patofisiológicos, como neutrofilia e febre (PERRY e cols., 1957; RIETCHEL e cols., 1994; BOZZA e cols., 1994). Embora seja comumente observado, este aumento no número de neutrófilos circulantes é um fenômeno pouco estudado, possivelmente por não se entender muito bem sua importância relativa na RFA.

A habilidade para induzir leucocitose, caracterizada por neutrofilia, é uma propriedade comum a diversas citocinas e mediadores da resposta inflamatória, incluindo IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8; análogos estáveis de prostaglandinas (PGs) E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e F<sub>2 $\alpha$</sub> ; C5a; PAF e catecolaminas (ULICH e cols., 1986; ULICH e cols., 1987; ULICH e cols., 1987a; ULICH e cols., 1989; KAJITA e HUGLI, 1990; HECHTMAN e cols., 1991; BERTINI e cols., 1993; KLOSTERHALFEN e cols., 1992; DALE, 1989; GORDON, 1955; ULICH e cols., 1989a; YANCEY, 1988). Todos estes mediadores são liberados direta ou indiretamente após a administração sistêmica de LPS, sugerindo que a neutrofilia pode resultar, de certo modo, da combinação dos vários mediadores liberados concomitantemente durante a endotoxemia (ULICH e cols., 1989a; DUNN, 1992; ZHOU e JONES, 1993).

Não está claro, em todos os casos, se a leucocitose é um efeito direto desses fatores ou seria induzida através de um mediador comum. ULICH e cols. (1987) demonstraram que pelo menos para IL-1, a leucocitose é induzida por mecanismos indiretos, pois pode ser revertida pelo tratamento dos animais com indometacina ou dexametasona. Estas drogas também foram capazes de inibir a fase tardia da resposta. É possível que entre os mediadores envolvidos estejam as PGs. Este estudo é corroborado pela observação de que análogos estáveis de PGs também promovem neutrofilia (ULICH e cols., 1986).

Recentemente foi demonstrado que injeções intravenosas (iv) ou intratorácicas (it) de LPS em ratos promovem neutrofilia. Nesse caso, a via de administração do LPS influencia o mecanismo de indução de neutrofilia, uma vez que a neutrofilia induzida por LPS it é sensível a antagonistas de PAF, como PCA

4248 e WEB 2086 (BOZZA e cols., 1994; ALTENBURG e cols., 1997). O conjunto de mediadores que vão mediar a RFA também dependem do sítio onde inicialmente ocorre a inflamação.

A neutrofilia é acompanhada da redução do número de neutrófilos presentes na medula óssea, indicando que essas células são recrutadas do conjunto de leucócitos da medula óssea (BOZZA e cols., 1994).

Finalmente, o sistema nervoso simpático também está envolvido na mobilização de neutrófilos da medula, induzida por LPS. A medula óssea é inervada por fibras simpáticas, e a norepinefrina está envolvida na hematopoiese, maturação e migração de várias células, especialmente quando se trata de respostas imunes (revisado por MADDEN e cols., 1995).

## **1.4 A Resposta Febril**

Os processos metabólicos de produção de calor pelos organismos dependem da temperatura ambiente. Contudo, os organismos homeotermos desenvolveram mecanismos de homeostase apropriados para manter suas temperaturas estáveis, os quais são coordenados pelo sistema nervoso central (SNC), particularmente o hipotálamo, onde localiza-se o sistema termorregulatório (HENSEL e cols., 1973; RUBEN, 1995). Este controlador central recebe as informações de temperatura, vindas de diferentes partes do corpo e integra estes sinais térmicos, determinando um ponto de regulação constante da temperatura corporal (BLIGH, 1979). No entanto, este ponto de regulação pode se mostrar alterado em algumas situações clínicas em que o indivíduo apresenta febre.

A resposta febril é um sinal clínico que pode ter início mediante a presença de neoplasias, alguns agentes farmacológicos, complexos antígeno-anticorpo, trauma, entre outros. Contudo, são nos processos de origem infecciosa (viroses ou infecções causadas por bactérias) que a febre é mais comum. Sabe-se que componentes bacterianos como o LPS e o muramil peptídeo, moléculas presentes na parede de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente, são responsáveis pela



indução da febre, sendo denominados pirogênios exógenos (PE<sub>x</sub>) (FOREMAN, 1994).

Assim, a febre consiste na elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de termorregulação hipotalâmico (DINARELLO e cols., 1988), alteração esta decorrente da presença de PE<sub>x</sub> no organismo.

Para que isto ocorra, no hipotálamo, mais especificamente na área pré-óptica do hipotálamo anterior (PO/HA), a frequência de disparos dos neurônios sensíveis ao calor diminui, enquanto que a dos neurônios sensíveis ao frio aumenta, o que caracteriza a elevação do termostato hipotalâmico (DINARELLO e cols., 1988). Esta alteração ativa mecanismos de produção e retenção de calor através do núcleo paraventricular (NPV) e de eferentes periféricos (tremores, vasoconstrição periférica, aumento da taxa metabólica pela secreção de hormônios tireoidianos e adrenais) e inibe mecanismos de perda de calor através do centro vasomotor (vasodilatação periférica), sudorese e redução da secreção de hormônios adrenais e tireoidianos (DINARELLO e cols., 1988; KLUGER, 1991; BLATTEIS e SEHIC, 1997). Portanto, a febre não resulta da incapacidade de regular a temperatura corporal, que ocorre principalmente quando o aquecimento do meio externo induz a uma passiva elevação de temperatura, processo denominado hipertermia.

Como outros componentes da RFA, a resposta febril pode ser benéfica para o hospedeiro infectado, pois a elevação da temperatura corporal facilita e acelera a ativação do sistema imune (KLUGER, 1991; KLUGER, 1994; GREEN e VERMEULEN, 1994).

Quando os PE<sub>x</sub> entram em contato com o hospedeiro, iniciando um processo inflamatório, ativam células fagocíticas (macrófagos e outros tipos celulares) a sintetizar e liberar mediadores da resposta febril, conhecidos como pirogênios endógenos (PE) (ATKINS, 1960). Entre os PE conhecidos, podemos destacar algumas citocinas como: IL-1 $\alpha$  e  $\beta$  (DINARELLO, 1984), interferon (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (DINARELLO e cols., 1984a; DINARELLO e cols., 1988), TNF $\alpha$  (DINARELLO e cols., 1986), IL-6 (HELLE e cols., 1988), proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 (MIP-1; DAVATELIS e cols., 1989; MIÑANO e cols., 1990), IL-8 (ROTHWELL e cols., 1990a; ZAMPRONIO e cols., 1994), fator neurotrófico ciliar

(SHAPIRO e cols., 1993) e IL-11 (LOPEZ-VALPUESTA e MYERS, 1994). Uma vez liberados, os PE levam a informação por eles codificada à PO/HA, sinalizando o SNC e causando uma alteração do ponto de regulação no centro termorregulatório.

Tem sido sugerido que IL-1, especificamente IL-1 $\beta$  é o principal mediador da resposta febril (LONG e cols., 1990; ROTHWELL, 1990). Essa citocina, natural ou recombinante, induz febre em diferentes espécies animais, seja administrada pela via central ou periférica (DINARELLO e cols., 1984; FARRAR e cols., 1987; LONG e cols., 1990). Injeções de IL-1 $\beta$  produzem elevação da temperatura de forma dose-dependente, e o pré-tratamento dos animais com o anti-soro de IL-1 $\beta$  ou antagonista de receptor de IL-1 (IL-1RA) inibiu a febre induzida por injeções intraperitoneais de vários estímulos (LeMAY e cols., 1990; LUHESHI e cols., 1996). Além disso, detectou-se o aumento dos níveis circulantes dessa citocina em animais e humanos que apresentavam febre (COOPER e cols., 1994; ENGEL e cols., 1994) bem como os receptores para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram localizados em neurônios e células da glia de várias regiões do cérebro de camundongos (BAN e cols., 1991; TAKAO e cols., 1990). Ainda, foi constatado que LPS administrado periféricamente aumenta os níveis plasmáticos e a expressão de IL-1 na PO/HA (KLUGER, 1991; GATTI e BARTFAI, 1993).

O papel do TNF na resposta febril ainda não está totalmente estabelecido, uma vez que essa citocina apresenta-se ora criogênica (TNF- $\alpha$  recombinante humano e recombinante murino - rm), ora pirogênica (TNF- $\alpha$  - rm) em ratos (STERFFEL e cols., 1996). A injeção sistêmica de LPS aumentou os níveis circulantes de TNF em animais experimentais, embora as concentrações plasmáticas de TNF não estejam correlacionadas com a febre (STERFFEL e cols., 1996). A injeção do antisoro inibiu tanto a atividade do TNF- $\alpha$  como a resposta febril (COOPER e cols., 1994). Os interferons (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são capazes de induzir febre com potência variada em diferentes espécies animais, sendo o IFN- $\gamma$  o mais potente entre eles (DINARELLO e cols., 1984a).

IL-6 é outra potente citocina que administrada via central ou periférica, é capaz de induzir febre em ratos e cobaias. Após a administração periférica de LPS induzindo febre, verificou-se uma elevação de IL-6 circulante e no perfusato hipotalâmico, bem como um aumento de TNF- $\alpha$  no plasma e no perfusato.

hipotalâmico (KLUGER, 1991; LeMAY e cols., 1990; KISHIMOTO e cols., 1993; KLIR e cols., 1993; ROTH e cols., 1993). Assim como o LPS, IL-1 $\beta$  também aumentou os níveis de IL-6 no fluido cerebrospinal (CSF), e a imuneutralização da IL-6 diminuiu a febre induzida pelo LPS (BERKENBOSCH e cols., 1992; LeMAY e cols., 1990; ROTHWELL e cols., 1991). SCHÖBITZ e cols., (1993) evidenciaram RNAm para IL-6 e para seu receptor no SNC, incluindo o hipotálamo dorsomedial e ventromedial. Em contraste com estes resultados, ratos com macrófagos periféricos depletados por diclorometileno difosfatado (Cl<sub>2</sub>MDP) continuaram apresentando concentrações plasmáticas elevadas de IL-6, porém, esses animais manifestaram redução das respostas pirogênicas e termogênicas, indicando que IL-6 circulante pode não ser um mediador diretamente importante na febre produzida por LPS em ratos, mas pode agir sinergicamente com outros pirogênios derivados de macrófagos (DERIJK e cols., 1993). Utilizando camundongos deficientes para o gene que codifica IL-6, CHAI e cols. (1996), verificaram que esses animais não desenvolveram febre após a administração periférica de LPS ou IL-1 $\beta$ , ou após a injeção central de IL-1 $\beta$ , em doses que induziram a elevação da temperatura em animais selvagens. Ainda em animais deficientes para IL-6, a administração de recombinante murino (rm) de TNF- $\alpha$  não foi capaz de desencadear a resposta febril nos animais, contudo, a febre foi reestabelecida com a administração concomitante de IL-6 (icv) e de rmTNF- $\alpha$  (ip), resultando em uma resposta similar àquela obtida com a linhagem selvagem que recebeu rmTNF- $\alpha$  (SUNDGREN-ANDERSON e cols., 1998). Esses resultados indicam que IL-6 central possui atividade pirogênica, além da sua importância na resposta febril induzida pelo TNF- $\alpha$  (CHAI e cols., 1996; LeMAY e cols., 1990; ROTHWELL e cols., 1991).

IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN induzem febre por promoverem a síntese e liberação de PGs no SNC (DINARELLO e cols., 1988; MORIMOTO e cols., 1992; ROTHWELL, 1990). A principal evidência disto consiste no efeito antipirético dos antiinflamatórios-não-esteroidais (AINEs), tais como a indometacina e o ibuprofeno, que bloqueiam essa resposta febril pela supressão da síntese de PGs através da inibição da ciclooxigenase (COX) (MILTON, 1989; SIRKO e cols., 1989). Existem duas isoformas da enzima COX, a COX-1 que é expressa constitutivamente nas células e a COX-2, que tem sua expressão seletivamente aumentada no cérebro

após um estímulo inflamatório, como LPS, IL-1 e TNF (FENG e cols., 1995). Utilizando camundongos com deficiência para o gene que codifica tanto COX-1 como COX-2, LI e cols. (1999), observaram que após a injeção periférica de LPS, somente os animais com genes nocauteados para a COX-2 não apresentaram febre, reforçando a importância da COX-2 na febre induzida por este pirogênio exógeno.

Além disso, a PGE<sub>2</sub> administrada pela via intra-cérebro-ventricular (icv) induz febre por atuar em neurônios sensíveis a variações de temperatura no hipotálamo (MURAKAMI e WATANABE, 1989), estimulando diretamente a termogênese. Foi demonstrado que a administração central de PGE<sub>2</sub> induz febre em ratos e que os níveis de PGE<sub>2</sub> no fluido cerebrospinal estavam aumentados durante a resposta febril (revisado por KLUGER, 1991). Também foi detectado que, em camundongos com deficiência para o subtipo EP<sub>3</sub> do receptor de PGE<sub>2</sub>, a administração tanto da própria PG (PGE<sub>2</sub> -icv) como de um PE (IL-1 $\beta$  -iv) ou ainda um PEx (LPS -iv) não induziram febre nesses animais, indicando a importância dessa PG na gênese da febre, e do envolvimento do subtipo de receptor EP<sub>3</sub> nessa resposta (USHIKUBI e cols., 1998). Contudo, o papel da PGE<sub>2</sub> como mediador neural da febre ainda é bastante discutido uma vez que a febre promovida por esta PG não foi inibida por seu antagonista (SC - 19920) (MITCHELL e cols., 1986).

A PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  é outro eicosanóide derivado do ácido araquidônico que parece ter participação efetiva como um dos indutores da resposta febril. Essa PG também induz aumento da temperatura corporal de ratos e coelhos quando administrada por via icv (MORIMOTO e cols., 1988; ROTHWELL, 1990) e ocorre aumento nas concentrações dessa PG no fluido cerebrospinal de ratos que receberam injeção periférica de endotoxina (COELHO e cols., 1995).

Contudo, existem evidências de que algumas citocinas induzem resposta febril em ratos por mecanismos independentes da síntese e liberação de PGs: a febre induzida por MIP-1 não foi modificada pelo tratamento dos animais com ibuprofeno ou indometacina (DAVATELIS e cols., 1989; MIÑANO e cols., 1990) e a febre induzida por IL-8 não foi reduzida pelo tratamento dos animais com indometacina (ZAMPRONIO e cols., 1994). Aparentemente, o efeito pirogênico da IL-8 é mediado pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH), pois a febre induzida por essa citocina foi inibida pelo antagonista de CRH ( $\alpha$ -helical CRH). O

efeito do CRH na termogênese está associado com a estimulação da via simpática, aumento da taxa metabólica e termogênese do tecido adiposo marrom, mas são independentes da síntese de PGs (ROTHWELL e HOPKINS, 1995).

Uma vez liberados, a informação codificada por estes PE deve ser traduzida em um sinal neuronal para a alteração do ponto de regulação no centro termorregulatório para um nível superior, resultando na resposta febril. O aumento no ponto de regulação hipotalâmico pelos PE está associado à síntese de PGs e CRH. Como consequência da indução de citocinas periféricas, diversas funções controladas pelo cérebro são modificadas, resultando no aparecimento de febre, anorexia, alterações comportamentais associadas à doença e ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) (KENT e cols., 1992; ROTHWELL e HOPKINS, 1995).

Embora o mecanismo pelo qual a informação gerada periféricamente alcança o centro termorregulatório não esteja totalmente elucidado, ou seja, como estas citocinas são capazes de promover a síntese de pirogênicos no SNC, existem várias hipóteses que tentam explicar como ocorre esta comunicação. Uma das hipóteses, em constante investigação, é a de que esta tradução ocorre em alguma região de contato estreito entre o sangue e as células neuronais. O *organum vasculosum da laminae terminalis* (OVLT), um dos órgãos circunventriculares com ausência de barreira hematoencefálica e próximo à PO/HA, é um dos possíveis candidatos (BLATTEIS e cols., 1983; STITT, 1985). Baseado no fato de que lesões eletrolíticas (BLATTEIS e cols., 1983) ou destruição da OVLT (HASHIMOTO e cols., 1994) reduzem a resposta febril induzida por IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  administrados intravenosamente, supõe-se que este órgão está de alguma maneira envolvido no desenvolvimento da resposta febril. Um possível mecanismo para a indução de febre via OVLT pressupõe que citocinas entram no espaço perivascular da OVLT, alterando as funções cerebrais por um mecanismo dependente de PGs. Esta hipótese baseia-se no fato de que IL-1 e outras citocinas podem estimular a síntese e liberação de PGE<sub>2</sub> dentro do cérebro (WATKINS e cols., 1995). PGs liberadas dentro do OVLT por citocinas de origem sangüínea podem se difundir por áreas adjacentes do cérebro ou ativar vias neuronais do hipotálamo, finalmente resultando em uma liberação intra-hipotalâmica de citocinas produzidas localmente.

Alternativamente, MATSUDA e cols. (1992) demonstraram que a  $PGE_2$  pode atenuar a atividade de neurônios termorregulatórios dentro da OVLT, contribuindo para a indução da resposta febril (BLATTEIS e cols., 1983; STITT, 1985). HASHIMOTO e cols. (1991) demonstraram que pode existir um mecanismo receptor para a IL-1 circulante nos vasos sangüíneos que circundam a OVLT. Este mesmo grupo demonstrou ainda que a destruição eletrolítica do OVLT reduz a resposta febril induzida por IL-1 $\beta$  e TNF administrados intravenosamente, sugerindo que este órgão está de alguma maneira envolvido no desenvolvimento da febre (HASHIMOTO e cols., 1994). A segunda hipótese, proposta por BANKS e cols. (1991), considera que citocinas hidrofílicas podem entrar no cérebro através da barreira hematoencefálica, mediadas por um sistema específico de transporte saturável, realizado por carreadores específicos. Outro possível mecanismo seria a ligação de citocinas ao endotélio vascular cerebral, gerando mediadores centrais. As interleucinas afetam o metabolismo de células endoteliais e por isso poderiam alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (MAIER e cols., 1990).

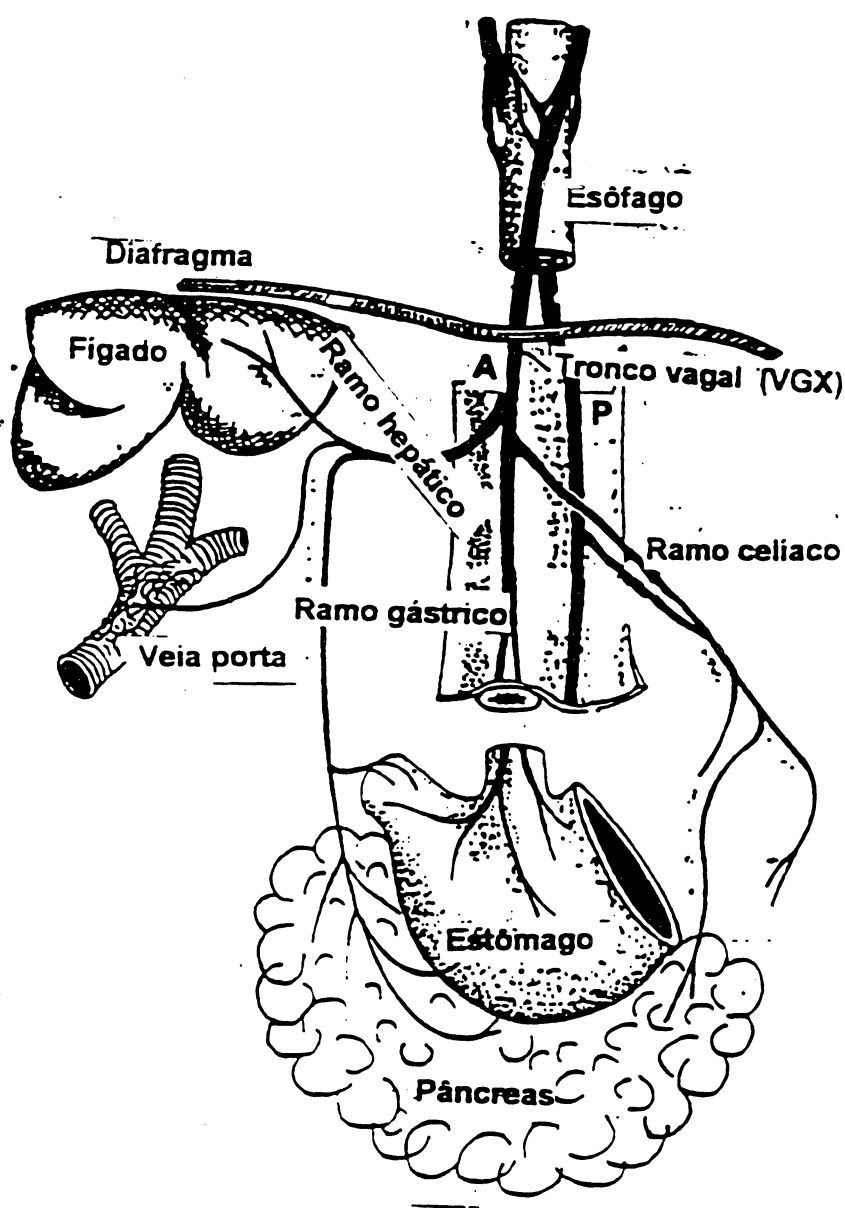
Finalmente, nos últimos anos, tem sido investigada a participação de nervos aferentes periféricos na comunicação entre elementos do sistema imune presentes na RI e na RFA e o hipotálamo, levantando a hipótese de que o transporte de sinais imunes ao cérebro induzindo febre durante a reação inflamatória não se deve exclusivamente por mecanismos humorais (ROTH, 1999). A vagotomia subdiafragmática tem sido eficiente em inibir respostas controladas pelo cérebro, induzidas perifericamente por LPS ou PE, incluindo a febre (WATKINS e cols., 1995a), a indução de RNAm para IL-1 $\beta$  no cérebro (LAYÉ e cols., 1995), hiperalgesia (WATKINS, 1994) e ativação do eixo HPA (FLESHNER e cols., 1995). A vagotomia subdiafragmática preveniu a resposta febril induzida por LPS e citocinas pirogênicas, como IL-1 $\beta$  em ratos e cobaias (OPP e TOTH, 1997; ROMANOVSKY e cols., 1997; WATKINS e cols., 1995a).

Evidências adicionais a favor do papel desempenhado pelo nervo vago na via de comunicação entre elementos do sistema imune (durante a RFA) e o cérebro podem ser encontradas em estudos recentes, que demonstram que a vagotomia subdiafragmática bloqueou a expressão de c-Fos no núcleo do trato solitário (área de projeção medular do nervo vago no cérebro) induzida pela administração

sistêmica (iv) de LPS ou IL-1 $\beta$ , (ERICSSON e cols., 1994; WAN e cols., 1994). SEHIC e BLATTEIS (1996) demonstraram ainda que, concomitantemente ao bloqueio da resposta febril, houve uma redução significativa da variação dos níveis de PGs no fluido cerebroespinal, sugerindo que a vagotomia estaria afetando a ativação central da resposta febril mais do que os mecanismos para sua efetivação (chegada de informações periféricas para a produção de calor, estimulada pelo aumento do ponto de regulação hipotalâmico).

O nervo vago é formado por cinco ramos: celíaco (anterior e posterior), gástrico (anterior e posterior) e hepático (ESQUEMA 1). No entanto, a vagotomia subdiafragmática consiste em seccionar o tronco vagal (anterior e posterior) imediatamente abaixo do diafragma, sendo que esse procedimento pode causar algumas complicações, tais como perda de peso acompanhada de desnutrição e morte, principalmente durante o período pós-operatório. Os animais vagotomizados (VGX) tendem a perder de 10 a 30% do seu peso dentro de um período de 10 a 15 dias após a cirurgia, e passado esse tempo, tendem a recuperar o peso inicial (GOLD e cols., 1980; LOUIS-SYLVESTRE, 1983; MARTIN e cols., 1979; MORDES e cols, 1977; SAWCHENKO e cols, 1981).

Todos estes autores confirmaram que não existiram diferenças nos pesos dos animais VGX e falso-operados (SHAM) durante a execução do experimento, garantindo que a ausência da resposta febril não estava relacionada à incompetência termorregulatória. Do ponto de vista termorregulatório, a desnutrição em animais VGX pode causar alterações metabólicas e na temperatura corporal, resultando então em uma incompetência termogênica (HOFFMAN-GOETZ e KLUGER, 1979; SHIDO e cols., 1989; SZÉKELY e cols., 1982). Em um estudo dirigido especificamente com a finalidade de avaliar essa possibilidade, ROMANOVSKY e cols. (1997), trataram animais VGX no período pós operatório com uma dieta complementar altamente calórica e observaram que nos animais VGX, o ganho de peso, taxa de crescimento e consumo de alimento foi idêntico ao do grupo falso-operado. Além disso, o mesmo grupo avaliou a competência termorregulatória em animais VGX, e verificou que esses animais respondiam a exposição ao frio e ao estresse com variações de temperaturas similares ao grupo falso-operado,



**ESQUEMA 1:** Representação anatômica esquemática da distribuição dos aferentes vagais no abdômen do rato: ramo hepático, ramo celiaco (anterior e posterior) e ramo gástrico (anterior e posterior). A vagotomia subdiafragmática consiste em seccionar o tronco vagal anterior e posterior imediatamente abaixo do diafragma (VGX). Segundo SIMONS e cols. (1998).



sugerindo que a vagotomia não promove uma incompetência termorregulatória (ROMANOVSKY e cols., 1997a).

Apesar dos animais VGX não apresentarem uma redução na quantidade de alimento ingerido, seus estômagos tendem a aumentar muito de tamanho devido à diminuição do tônus e da motilidade gastrointestinal (ELLIS e cols., 1967; MARTIN e cols., 1979; MORDES e cols., 1977; SAWCHENKO e GOLD, 1981). Devido a esta alteração, ROMANOVSKY e cols. (1997) utilizaram tanto o peso absoluto do estômago (em gramas), como a radiografia do esôfago e região fúndica do estômago, que sofrem uma grande dilatação, para comprovar se os animais utilizados em seus experimentos estavam realmente vagotomizados.

Os níveis de  $PGE_2$  no cérebro de cobaias foram reduzidos quando os animais foram submetidos a vagotomia subdiafragmática (SEHIC e cols., 1997), apesar dos níveis plasmáticos de IL-1 $\beta$  e macrófagos não estarem alterados.

Embora existam vários resultados indicando que a vagotomia subdiafragmática exerce um importante papel na resposta febril, alguns autores não conseguiram observar seus efeitos nesse modelo. LUHESHI (1998) não verificou a ausência de febre em animais VGX, utilizando LPS e IL-1 em doses pirogênicas e CALDWELL e cols. (1999), também não encontraram diferenças entre a febre induzida por LPS ip ou iv em animais VGX e falso-operados, independentemente da rota de administração do pirogênio.

Os efeitos causados pela vagotomia subdiafragmática dividem a opinião dos pesquisadores sobre a participação do nervo vago na resposta febril, evidenciando algumas interpretações alternativas, como a do grupo de SCAMMEL e cols. (1988). Esse grupo sugere que a ausência da resposta febril em animais VGX é consequência de complicações da cirurgia, como insuficiência termorregulatória e ainda translocação de bactéria intestinais através da circulação porta, resultando em um fenômeno de tolerância ao LPS e conseqüente ausência de febre.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Os estudos apresentados demonstram claramente que os existem alguns mediadores comuns envolvidos na RI (migração celular, particularmente) e na RFA (febre e leucocitose). Entretanto, estudos sistemáticos comparando a indução destas respostas ainda não foram realizados. O objetivo de correlacionarmos os dois fenômenos baseia-se no fato de que, embora as células presentes no foco inflamatório sejam consideradas as principais fontes de citocinas para a efetivação da resposta febril, estudos realizados em nossos laboratórios sugerem que a corrente sangüínea não é o principal meio de comunicação destas células com o SNC (ZAMPRONIO, 1998). Não encontramos uma relação direta entre os níveis destes mediadores no local da resposta inflamatória com os níveis circulantes ou centrais dos mesmos para a indução de resposta febril. Então, para melhor compreendermos como se processa a comunicação entre os eventos ocorridos no foco inflamatório (migração celular), eventos sistêmicos que não necessitam de comunicação com o SNC (leucocitose) e eventos onde esta comunicação do sistema mononuclear fagocitário com o SNC ocorre (resposta febril), utilizamos o modelo da vagotomia subdiafragmática, pois ao lado da entrada de citocinas pela OVLT através da corrente sangüínea, a estimulação vagal parece ser uma outra via de comunicação entre a periferia e o SNC. Portanto, em animais vagotomizados, estudamos a febre, a leucocitose e a migração de neutrófilos induzidas por injeções de LPS no peritônio.

## **2.2 Objetivos específicos**

Assim, o presente estudo propôs-se à:

- Estabelecer as curvas dose-resposta e o curso temporal para o desenvolvimento das respostas de migração celular, leucocitose e febre em animais normais;
- Avaliar se as cavidades peritoneais de animais VGX apresentam o mesmo número de células que aquelas encontradas em animais normais;
- Avaliar o desenvolvimento das respostas de migração celular, leucocitose e febre em animais VGX em diferentes tempos após a administração de diferentes doses de LPS.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Animais**

Nos experimentos, foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 180-200g, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, e mantidos em condições controladas de temperatura (24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água. Os animais foram levados para a sala de ambientação no mínimo 2 dias antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 17:00 h.

#### **3.1.2 Drogas**

- Éter etílico (Pro Analysis);
- Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS 0111:B4 – Sigma);
- Tiopental (Cristalia);
- Terramicina<sup>®</sup>/LA (Pfizer).

#### **3.1.3 Soluções**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Solução de Salina Tamponada (PBS);
- Solução de albumina bovina 3%;
- Líquido de Turk;
- Corante Pancrômico de Rosenfeld;
- Azul de Pontamina 1%.

### **3.1.4 Esterilização**

Os materiais utilizados nos experimentos foram adquiridos estéreis ou autoclavados a 121°C por 30 minutos.

Quando necessário, as soluções foram preparadas em condições assépticas.

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Vagotomia subdiafragmática**

O procedimento cirúrgico foi executado utilizando a técnica descrita por BLUTHÉ e cols. (1996). Os animais a serem vagotomizados foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg ip. Após a tricotomia e antissepsia da pele, foi feita uma incisão no abdômem e posteriormente no tecido muscular, a fim de alcançarmos o estômago e consequentemente o esôfago dos animais, pois na porção subdiafragmática, os troncos principais ventral e dorsal do nervo vago estão em contato direto com o esôfago. Os troncos vagais foram então seccionados imediatamente abaixo do diafragma, e ainda, removeu-se todo o tecido entre a artéria gástrica e o esôfago, por uma extensão de 2-3 cm ao longo desta região. Este procedimento assegurou a secção de ramos vagais acessórios, tal como o ramo celíaco. Animais controle (falso-operados) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem o manuseio ou corte dos nervos. Este procedimento está apresentado no ESQUEMA 1 (INTRODUÇÃO, página 16). Ao final da cirurgia, todos os ratos receberam uma injeção intramuscular de terramicina (0.2 mL/animal), e dois dias após, receberam reforço do antibiótico. A fim de evitar uma perda de peso severa, os animais foram tratados com flocos de cereais (trigo, cevada e aveia) como complemento alimentar. Os experimentos foram conduzidos 15 dias após a cirurgia e os animais que apresentaram peso abaixo do normal foram descartados.

### **3.2.2 Determinação da variação da temperatura corporal**

Os animais foram transportados para uma sala climatizada, cuja temperatura ambiente foi mantida a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , no mínimo 72 h antes do início dos experimentos. Durante o experimento, a temperatura ambiente foi controlada a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  (zona de termoneutralidade para ratos).

Os animais foram mantidos dentro de suas respectivas gaiolas, e manuseados o mínimo possível durante as medidas. A temperatura retal foi medida por inserção de uma sonda (CE nº 400, USA) a 3,0 cm de profundidade no reto dos animais, conectada a um teletermômetro (modelo 600-8525 BARNANT COMPANY, EUA). Os animais foram adaptados às condições experimentais através da realização desse procedimento, no mínimo três vezes, no dia anterior ao experimento, objetivando minimizar possíveis variações de temperatura ocasionadas por estresse do manuseio.

As temperaturas basais foram determinadas por 3 ou mais medidas, em intervalos de 30 minutos, antes da administração do estímulo pirogênico. Somente foram utilizados os animais com temperatura estável e na faixa de  $36,8$  a  $37,4^\circ\text{C}$ . Após administração dos estímulos, as medidas continuaram a ser realizadas em intervalos de 30 minutos, por um período de 6 horas.

### **3.2.3 Coleta de sangue e do fluido inflamatório da cavidade peritoneal**

Os animais foram anestesiados com éter 1,5; 3 e 6 horas após a administração do estímulo inflamatório. O sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca, utilizando seringas contendo heparina. A seguir, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo realizada uma incisão no abdômem para a exposição do tecido muscular. As cavidades peritoneais receberam 10,0 mL de solução de PBS contendo albumina 0,03% (p/v) e heparina 5U/mL. Após suave massagem com o auxílio de uma gaze, aspirou-se um volume de aproximadamente 7,0 mL do fluido peritoneal, utilizando seringas e agulhas apropriadas.



### **3.2.4 Contagem total e diferencial de leucócitos no fluido peritoneal e sangue**

Para a contagem total do número de leucócitos, amostras de sangue e do fluido peritoneal foram diluídos em solução de Turk. A contagem global foi realizada em câmaras de Neubauer utilizando-se microscópio óptico.

Para a contagem diferencial de células do fluido peritoneal, este foi centrifugado a 1000 rpm, 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado enquanto que o sedimento contendo as células foi ressuspenso em 300µL de solução de albumina a 3% (p/v). Com o auxílio de pipeta Pasteur, a suspensão foi aplicada sobre uma lâmina de vidro contendo uma tira de papel de filtro, fixada por fita adesiva, com dois orifícios, concentrando portanto, as células em dois campos.

Para a contagem específica dos leucócitos do sangue foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro.

As lâminas foram coradas com o corante pancrômico de Rosenfeld. A contagem diferencial dos leucócitos do fluido peritoneal e do sangue foi realizada em microscópio óptico, usando objetiva de imersão. Foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-se quatro tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mastócitos/basófilos e células mononucleares.

### **3.2.5 Avaliação de células residentes na cavidade peritoneal**

O número total e diferencial de células presentes na cavidade peritoneal de animais falso-operados e VGX que não receberam qualquer estímulo inflamatório foi avaliado conforme descrito nos itens acima.

Para avaliação da viabilidade destas células, 0.1 mL de suspensão de células foi adicionada à uma lâmina de vidro. Esta suspensão recebeu 0.1 mL de solução de Azul de Pontamina 1% (p/v). As células foram então recobertas com lamínulas apropriadas e após alguns segundos, avaliadas por microscopia ótica. A avaliação se deu através da contagem de 100 células, determinando-se a porcentagem de células viáveis. Foram consideradas viáveis as células onde não se evidenciou a presença de corante no citoplasma (HANKS e WALLACE, 1985).

### **3.2.6 Avaliação do peso dos estômagos de animais falso-operados e VGX**

Após a realização dos experimentos, animais falso-operados e VGX foram sacrificados e os estômagos retirados com a finalidade de verificar a eficiência da cirurgia de vagotomia subdiafragmática. Os estômagos foram removidos, seccionados na região do esôfago e do piloro, limpos para eliminar restos de alimentos, e pesados em uma balança analítica. O peso absoluto do estômago foi expresso em miligramas (mg) (ROMANOVSKY e cols., 1997 b).

### **3.2.7 Análise estatística**

O número de células obtidos, tanto para migração leucocitária como para leucocitose foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) do número de células/mm<sup>3</sup>. As respostas febris foram avaliadas pela variação da temperatura retal dos animais em °C e expressa como média  $\pm$  EPM da variação entre as médias das temperaturas basais e a diferentes tempos após a injeção do estímulo (variação da temperatura corporal -  $\Delta T_c$ ). A diferença entre os tratamentos foi avaliada por análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY) seguida por teste de Bonferroni para as comparações múltiplas. O nível de significância considerado foi de 5%.

Para a análise de dois grupos, a diferença foi avaliada pelo teste "t" não pareado. Os resultados obtidos neste caso foram expressos como média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais e ainda média  $\pm$  EPM do peso dos estômagos em miligramas.

## **4. RESULTADOS**

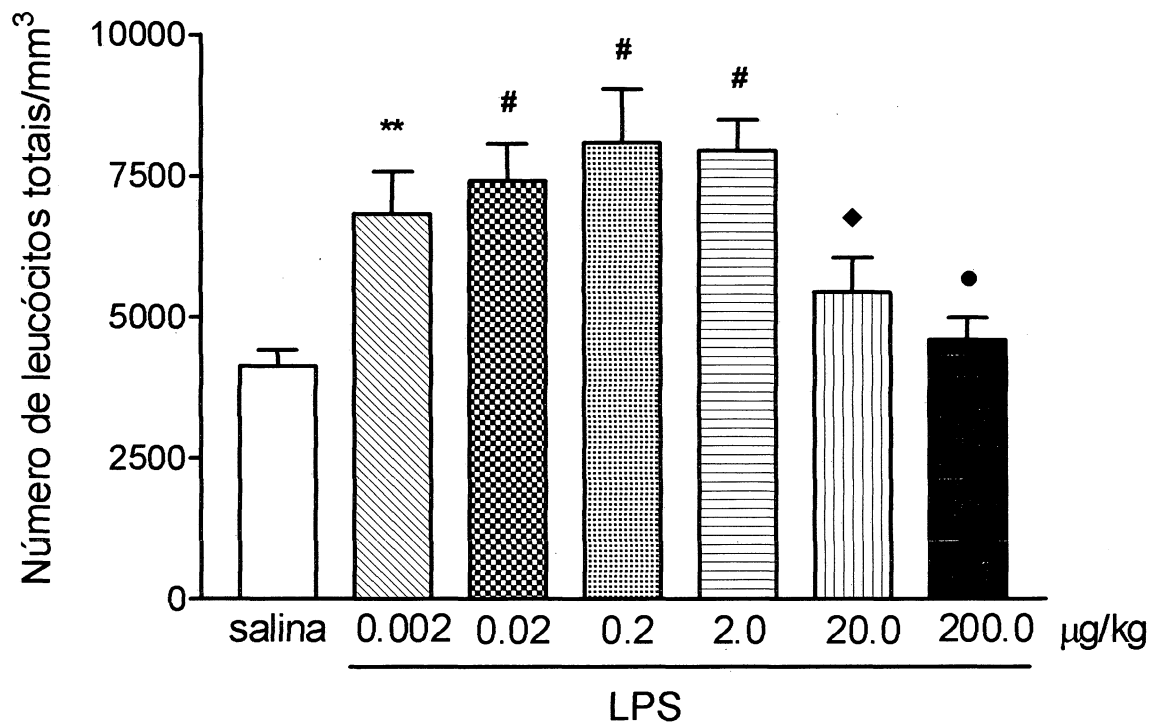
#### **4.1 CURVA DOSE RESPOSTA DO LPS NA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS**

Os valores apresentados nos gráficos referentes aos resultados de migração leucocitária e leucocitose (contagem global), incluindo os valores obtidos na diferenciação celular (neutrófilos, eosinófilos e mononucleares) encontram-se no apêndice 2.

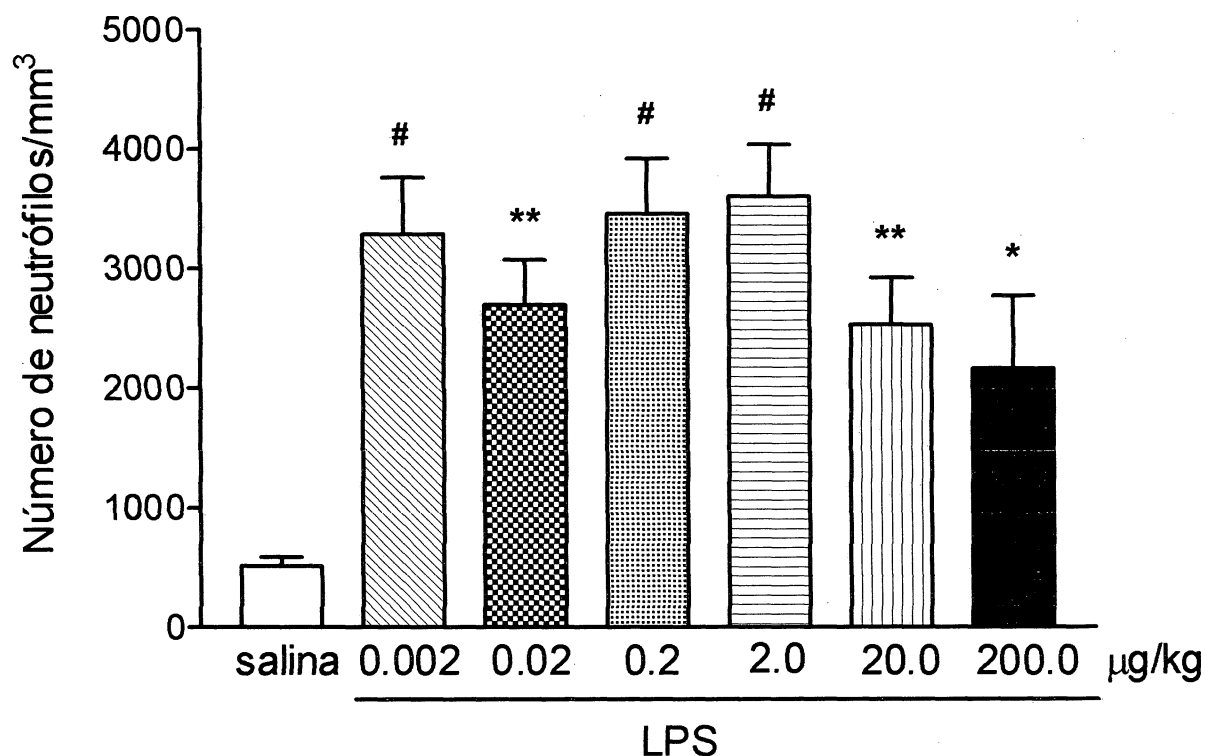
A administração de LPS nas doses de 0.002 a 2.0 $\mu$ g/kg (ip) promoveu um aumento significativo no número de leucócitos totais para a cavidade peritoneal dos animais, quando comparados ao grupo salina, 6 horas após os tratamentos (FIG. 1). Este aumento deveu-se principalmente a um aumento no número de neutrófilos (FIG. 2).

Doses de LPS superiores a estas (20.0 e 200.0  $\mu$ g/kg) induziram uma diminuição significativa no número de leucócitos totais, que se refletiu no número de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal (FIGS. 1 e 2).

Quanto ao número de outros leucócitos encontrados no exsudato peritoneal, não houve diferenças entre as células mononucleares, porém observou-se um aumento no número de eosinófilos somente com LPS na dose de 2.0 $\mu$ g/kg, comparado ao grupo controle (salina) (apêndice 2).



**FIG. 1:** Migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal de ratos estimulada por LPS. Os animais receberam LPS em doses crescentes ou salina estéril (1mL/200g), ambos por via ip e o número de leucócitos foi avaliado **6 horas** após os tratamentos. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais /mm<sup>3</sup> (n= 10-20). \*\* Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,01$ ; # Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,001$ ; ♦ Diferença significativa em relação ao grupo LPS 0.2µg/kg,  $P < 0,01$ ; • Diferença significativa em relação ao grupo LPS 0.2µg/kg,  $P < 0,001$ .

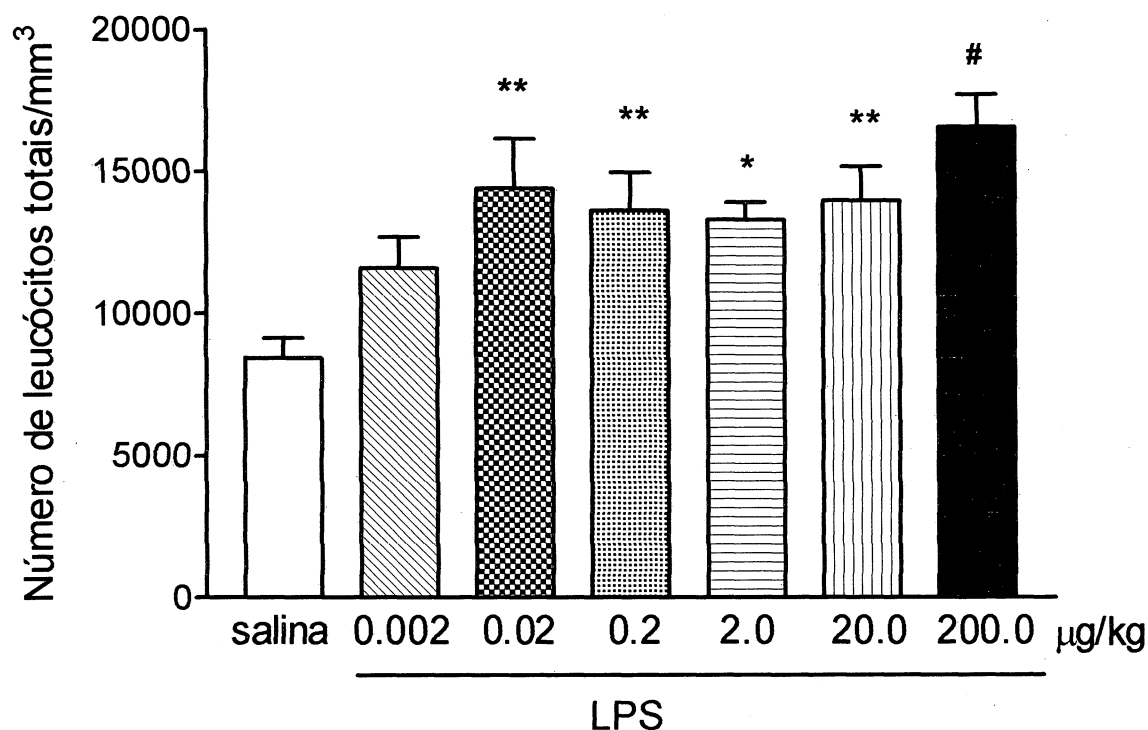


**FIG. 2:** Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos estimulada por LPS. Os animais receberam LPS em doses crescentes ou salina estéril (1mL/200g), ambos por via ip e o número de neutrófilos foi avaliado **6 horas** após os tratamentos. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/mm<sup>3</sup> (n= 7-11). \* Diferença significativa em relação ao grupo salina , P<0,05. \*\* Diferença significativa em relação ao grupo salina, P<0,01; # Diferença significativa em relação ao grupo salina, P<0,001.

## **4.2 CURVA DOSE RESPOSTA DO LPS NA LEUCOCITOSE**

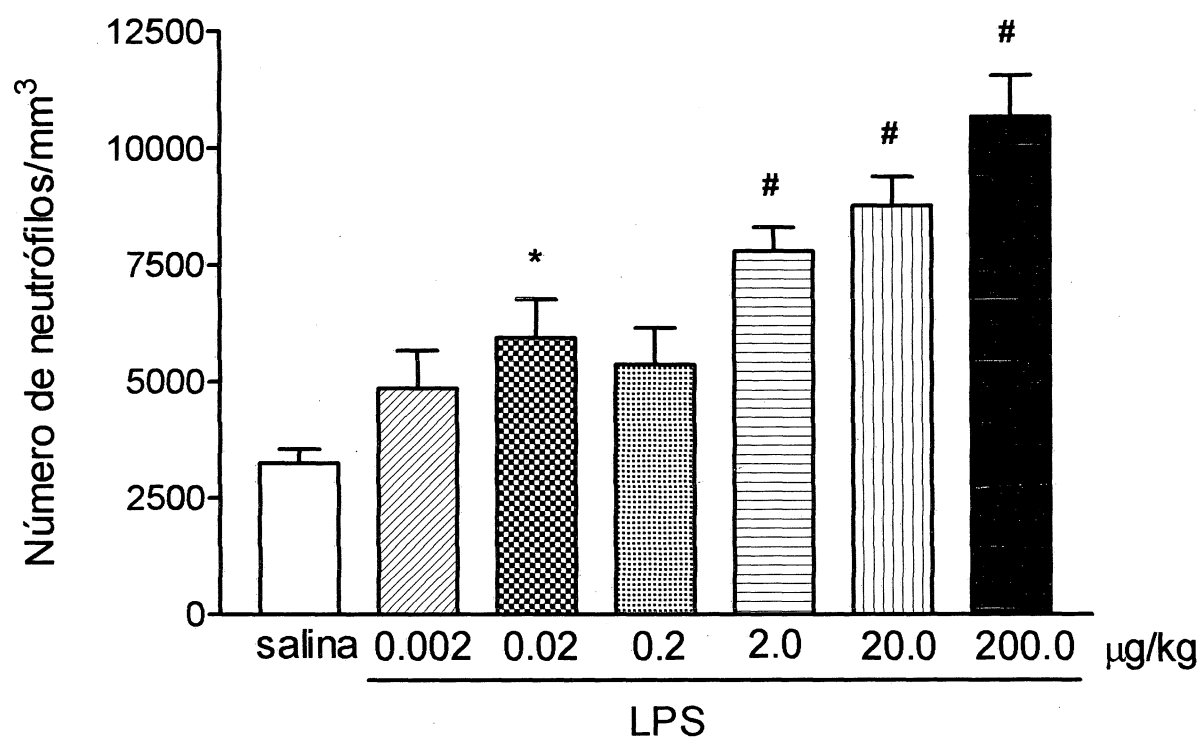
O número de leucócitos totais circulantes em animais tratados com LPS 0.02 a 200.0µg/kg mostrou-se significativamente aumentado quando comparados ao grupo salina, 6 horas após os tratamentos (FIG. 3). Esta leucocitose deveu-se principalmente por uma neutrofilia dose dependente (FIG. 4).

Não foram encontradas diferenças significativas no número de mononucleares circulantes, contudo, observamos uma eosinofilia nos animais tratados com LPS 0.02 µg/kg, comparado ao grupo controle (apêndice 2).



**FIG. 3:** Variação no número de leucócitos totais circulantes induzida por LPS. LPS nas doses acima descritas e salina estéril (1mL/200g) foram administrados por via ip e as amostras de sangue foram coletadas **6 horas** após os tratamentos por punção cardíaca. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos/mm<sup>3</sup> (n=8-13). \* Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,05$ . \*\* Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,01$ ; # Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,001$ .



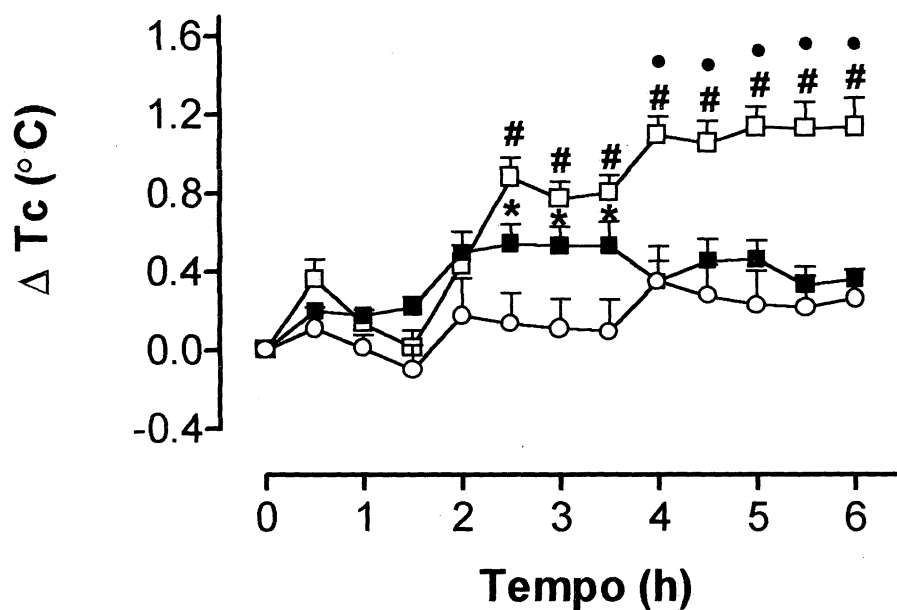


**FIG. 4:** Variação no número de neutrófilos circulantes induzida por LPS. LPS nas doses acima descritas e salina estéril (1mL/200g) foram administrados por via ip e as amostras de sangue foram coletadas **6 horas** após os tratamentos por punção cardíaca. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/mm<sup>3</sup> (n=7-16). \* Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,05$ ; # Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,001$ .

### **4.3 CURVA DOSE-RESPOSTA DO LPS NA RESPOSTA FEBRIL**

A administração de LPS 0.2 µg/kg induziu um aumento da temperatura corporal, com início a partir da 2ª hora, atingindo o pico da resposta na 2,5 hora ( $0.544 \pm 0.102$  °C). A temperatura voltou ao normal na 4ª hora, permanecendo até a 6ª hora após o tratamento (FIG. 5).

Por outro lado, a dose maior do estímulo, LPS 200.0 µg/kg, induziu uma resposta febril de maior magnitude do que aquela observada para a menor dose. O aumento da temperatura teve início a partir da 2,5 hora, atingindo o pico da resposta na 4ª hora ( $1.100 \pm 0.098$  °C). A temperatura permaneceu elevada até a 6ª hora após o tratamento ( $1.42 \pm 0.15$  °C) (FIG.5).



**FIG. 5:** Resposta febril induzida pela administração ip de LPS. Os animais receberam salina 1mL/200g ( ○ ) ou LPS nas doses de 0.2 μg/kg ( ■ ) ou 200.0 μg/kg ( □ ). Os pontos representam a média ± EPM da variação da temperatura corporal (°C) dos animais (n= 9-12). \* Diferença significativa em relação ao grupo salina, P<0,05; # Diferença significativa em relação ao grupo salina, P<0,001; ● Diferença significativa em relação ao grupo LPS 0.2 μg/kg, P<0,001.

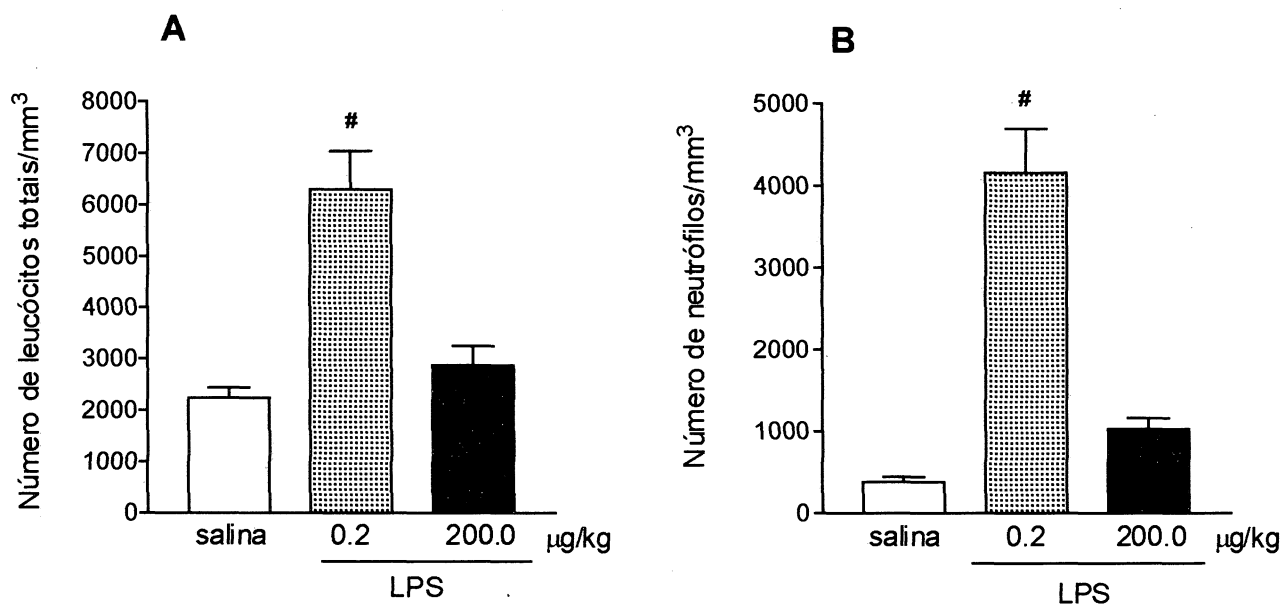
#### **4.4 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE COLHEITA DO FLUIDO PERITONEAL E DO SANGUE**

Para avaliação do tempo de colheita foram utilizadas as duas doses de LPS que representam os picos de migração de leucócitos para a cavidade peritoneal e de leucocitose, sendo 0.2 e 200.0  $\mu\text{g/kg}$ , respectivamente. Estes parâmetros foram avaliados nestas doses, nos tempos de 1,5 e 3 horas após a administração do LPS.

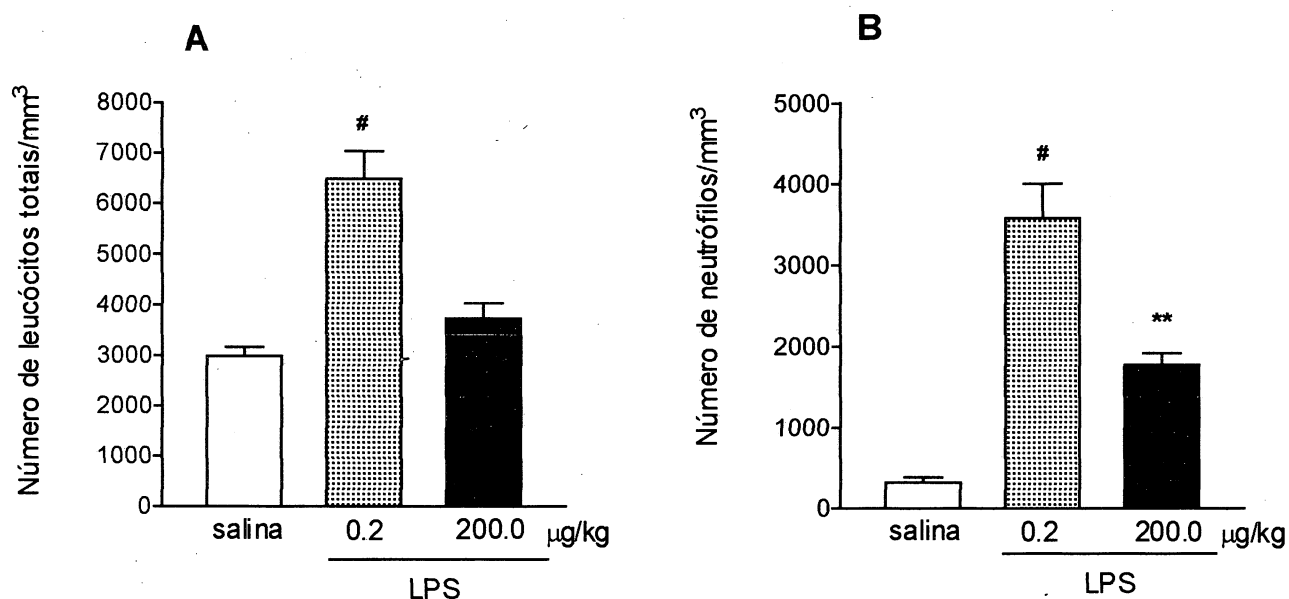
As figuras 6 e 7 mostram a migração de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) para as cavidades peritoneais de ratos, 1,5 e 3 horas, respectivamente após a administração do estímulo. A administração de LPS na dose de 0.2  $\mu\text{g/kg}$  - ip promoveu um aumento no número de leucócitos (FIGS. 6A e 7A) e de neutrófilos (FIGS. 6B e 7B) que migraram para a cavidade peritoneal, de maneira similar em 1,5 e 3 horas após os tratamentos. Estes valores foram semelhantes àquele obtido na 6ª hora (FIG.2). Na maior dose, 200.0  $\mu\text{g/kg}$ , como já havíamos detectado na 6ª hora (FIG.2), houve uma diminuição da migração leucocitária para a cavidade peritoneal, que foi mais evidente na 3ª hora (FIG. 7) do que em 1,5 hora (FIG. 6). Não foram encontradas diferenças no número de leucócitos mononucleares 1,5 hora após os tratamentos com LPS, porém, na 3ª hora, verificou-se monocitopenia (salina:  $2305.17 \pm 144.39$ ; LPS 0.2  $\mu\text{g/kg}$ :  $1928.5 \pm 194.57$ ; LPS 200.0  $\mu\text{g/kg}$ :  $1300.3 \pm 110.38$ ). Quanto ao número de eosinófilos, observamos eosinofilia para a menor dose em 1,5 hora e para as duas doses de LPS na 3ª hora (apêndice 2).

As figuras 8 e 9 mostram o número de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B) circulantes, 1,5 e 3 horas, respectivamente, após a administração do estímulo. Com relação a leucocitose, observamos que 1,5 hora após a administração de LPS, nenhuma das doses induziu qualquer aumento no número de leucócitos totais (FIG. 8 A) e neutrófilos circulantes (FIG. 8 B). No entanto, na 3ª hora já podemos detectar um aumento significativo no número de neutrófilos circulantes com ambas as doses de LPS (0.2  $\mu\text{g/kg}$  e 200.0  $\mu\text{g/kg}$ , FIG. 9 B). Vale notar que, para a dose menor (0.2  $\mu\text{g/kg}$ ) a neutrofilia foi maior na 3ª hora do que na 6ª hora (FIG.4) enquanto que para a dose maior (200.0  $\mu\text{g/kg}$ ) a neutrofilia aumentou em decorrência do tempo (FIGS. 4; 8B e 9B). Quanto ao número de outros leucócitos circulantes, não observamos

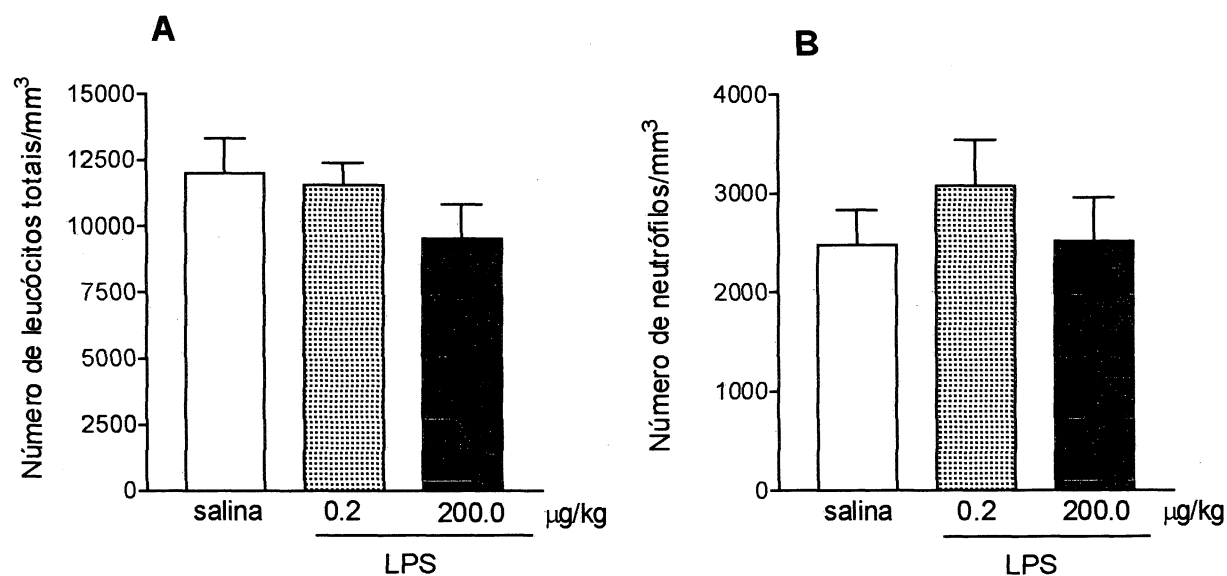
diferenças no número de mononucleares na 1,5 hora após os tratamentos, contudo, na 3ª hora, observamos monocitopenia para a maior dose de LPS (salina:  $6359.2 \pm 515.47$ ; LPS 200.0  $\mu\text{g/kg}$ :  $3648.8 \pm 355.39$ ). Observamos uma eosinofilia somente 1,5 hora após os tratamentos, para a menor dose do estímulo (apêndice 2).



**FIG. 6:** Migração de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) para a cavidade peritoneal de ratos estimulados por LPS. Os animais receberam LPS nas doses acima citadas ou salina estéril (1mL /200g), ambos por via ip e o número de células foi avaliado **1,5 hora** após os tratamentos. No painel A, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (n=6-12). No painel B, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/mm<sup>3</sup> (n=6-11). # Diferença significativa em relação ao grupo salina, P<0,001.

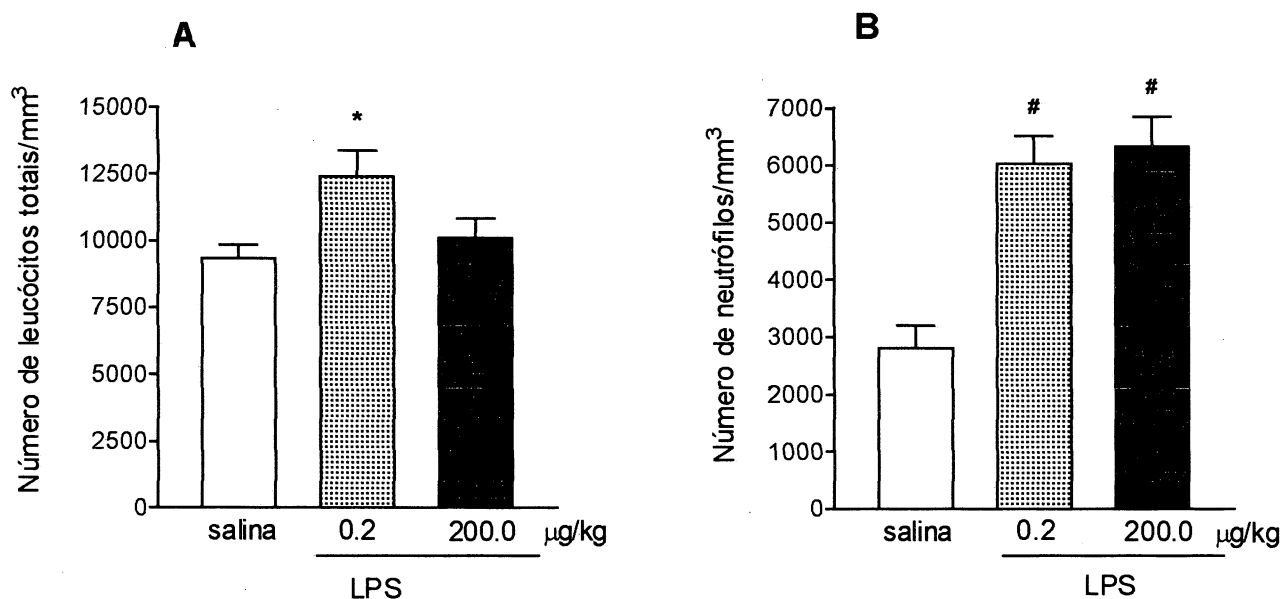


**FIG. 7:** Migração de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) para a cavidade peritoneal de ratos estimulados por LPS. Os animais receberam LPS nas doses acima citadas ou salina estéril (1mL/200g), ambos por via ip e o número de células foi avaliado **3 horas** após os tratamentos. No painel A, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (n=11-12). No painel B, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/mm<sup>3</sup> (n=7-10). \*\* Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,01$ . # Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,001$ .



**FIG. 8:** Variação no número de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) circulantes induzidos por LPS. Salina estéril (1mL/200g) e LPS nas doses acima citadas foram injetados via ip nos ratos e as amostras de sangue foram coletadas após **1,5 hora**. No painel A, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais/ $\text{mm}^3$  (n=6-10). No painel B, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/ $\text{mm}^3$  (n=6-9).

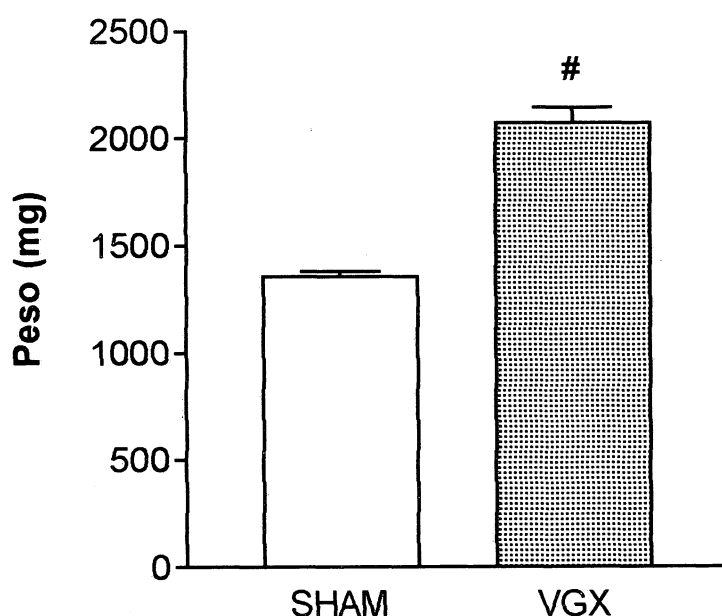




**FIG. 9:** Variação no número de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) circulantes induzidos por LPS. Salina estéril (1mL/200g) e LPS nas doses acima citadas foram injetados via ip nos ratos e as amostras de sangue foram coletadas após **3 horas**. No painel A, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (n=11). No painel B, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/mm<sup>3</sup> (n=10-12). \* Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,05$ ; # Diferença significativa em relação ao grupo salina,  $P < 0,001$ .

#### 4.5 PESO DOS ESTÔMAGOS DE ANIMAIS VGX E FALSO-OPERADO

A efetividade da cirurgia de vagotomia subdiafragmática foi avaliada após a retirada do estômago, através da pesagem direta do órgão, de ambos os grupos. Os animais VGX apresentaram o peso absoluto do estômago (em miligramas) significativamente maior do que os animais do grupo falso-operado (FIG. 10).

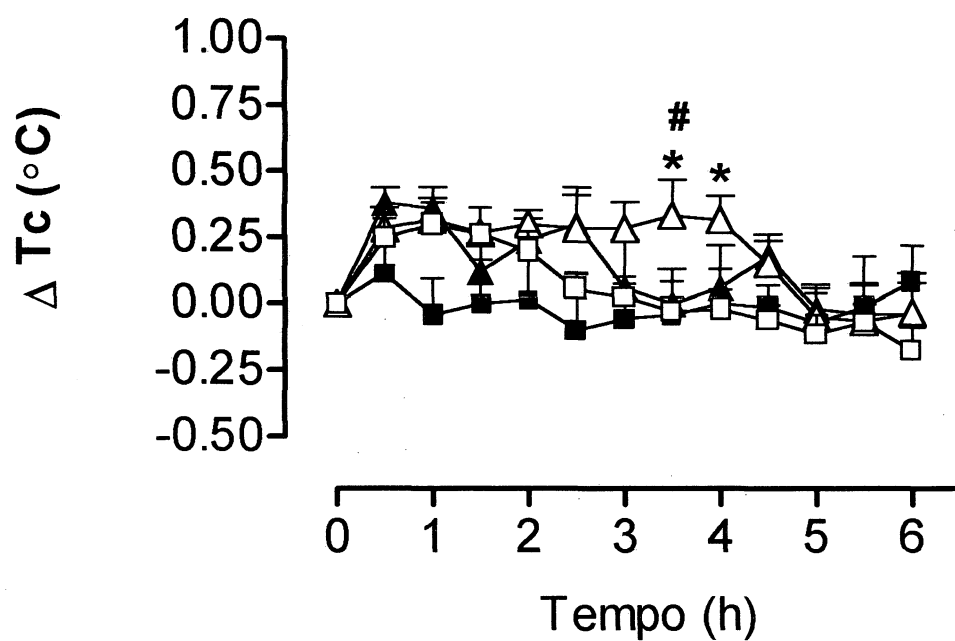


**FIG. 10:** Peso absoluto do estômago de animais VGX e falso-operado. As barras representam a média  $\pm$  EPM do peso dos estômagos em miligramas ( $n = 52$ ). # Diferença significativa em relação ao grupo SHAM,  $P < 0,001$ .

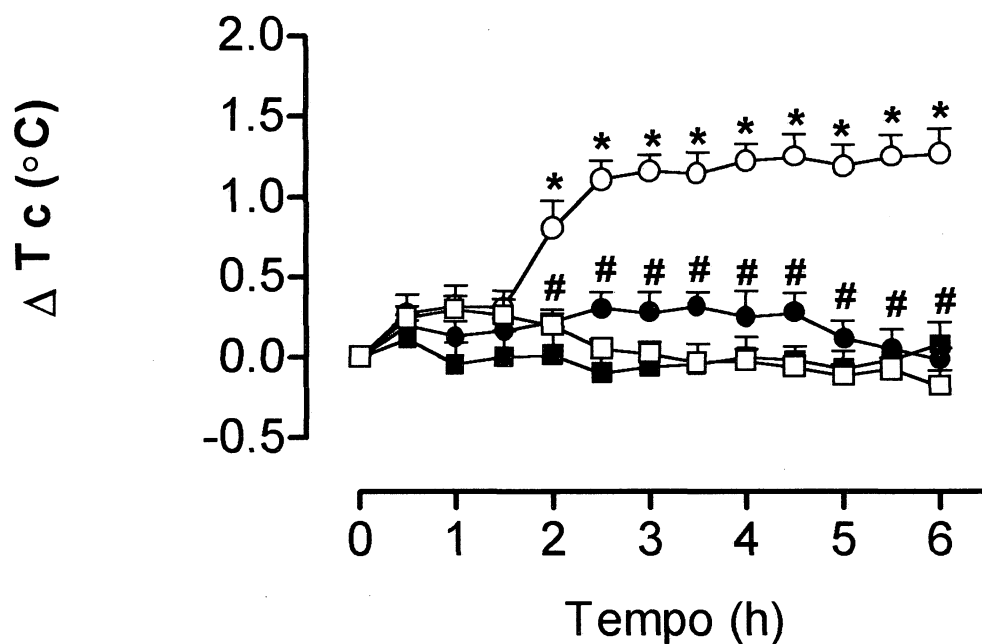
#### **4.6 RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS EM RATOS VGX**

A administração de LPS na dose de 0.2 µg/kg promoveu uma pequena, mas significativa elevação da temperatura corporal em ratos falso-operados, quando comparados aos respectivo grupo controle (salina) (FIG. 11). A resposta febril teve início a partir da 2,5 hora atingindo pico em 3,5 hora (SHAM salina:  $-0.031 \pm 0.055$  °C; SHAM LPS:  $0.333 \pm 0.136$  °C) e, de como já observado em animais não operados (FIG. 5), a temperatura permaneceu baixa até a 6ª hora. Animais VGX que receberam o mesmo estímulo pirogênico não apresentaram febre (3,5 hora: VGX salina:  $-0.043 \pm 0.129$  °C e VGX LPS:  $0.000 \pm 0.130$  °C).

Por outro lado, a dose pirogênica de LPS (200.0 µg/kg-ip) aumentou a temperatura corporal de animais falso-operados, quando comparados ao grupo falso-operado salina. A febre iniciou-se a partir da 2ª hora, atingindo pico em 2,5 hora (SHAM salina:  $0.054 \pm 0.058$ ; SHAM LPS:  $1.109 \pm 0.117$ ) e a elevação da temperatura manteve-se até a 6ª hora. Contudo, animais VGX que receberam a mesma dose de LPS não apresentaram elevação da temperatura corporal, quando comparados ao grupo falso-operado LPS (3ª hora: VGX salina :  $-0.057 \pm 0.157$ °C; VGX LPS:  $0.278 \pm 0.128$ °C) (FIG. 12).



**FIG. 11:** Resposta febril induzida pela administração ip de LPS em ratos VGX e falso-operados. Os animais receberam LPS na dose de 0.2  $\mu\text{g/kg}$  (SHAM  $\Delta$  e VGX  $\blacktriangle$ ) ou salina estéril 1mL/200g (SHAM  $\square$  e VGX  $\blacksquare$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da variação da temperatura corporal ( $^{\circ}\text{C}$ ) dos animais ( $n = 5 - 13$ ). \* Grupo SHAM LPS estatisticamente diferente do grupo SHAM salina,  $P < 0.05$ ; # Grupo SHAM LPS estatisticamente diferente do grupo VGX LPS,  $P < 0.05$ .



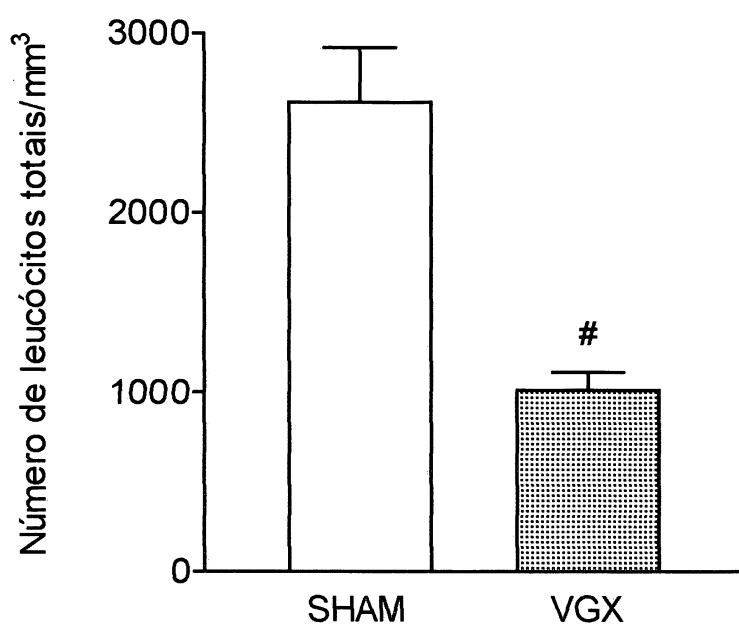
**FIG. 12:** Resposta febril induzida pela administração ip de LPS em ratos VGX e falso-operados. Os animais receberam LPS na dose de 200.0  $\mu\text{g/kg}$  (SHAM  $\circ$  e VGX  $\bullet$ ) ou salina estéril 1 mL/200 g (SHAM  $\square$  e VGX  $\blacksquare$ ). Os pontos representam a média  $\pm$  EPM da variação da temperatura corporal ( $^{\circ}\text{C}$ ) dos animais ( $n = 7 - 13$ ).  
 \* Grupo SHAM LPS estatisticamente diferente do grupo SHAM salina,  $P < 0,001$ ;  
 # Grupo VGX LPS estatisticamente diferente do grupo SHAM LPS,  $P < 0,001$ .

#### **4.7 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS RESIDENTES NA CAVIDADE PERITONEAL**

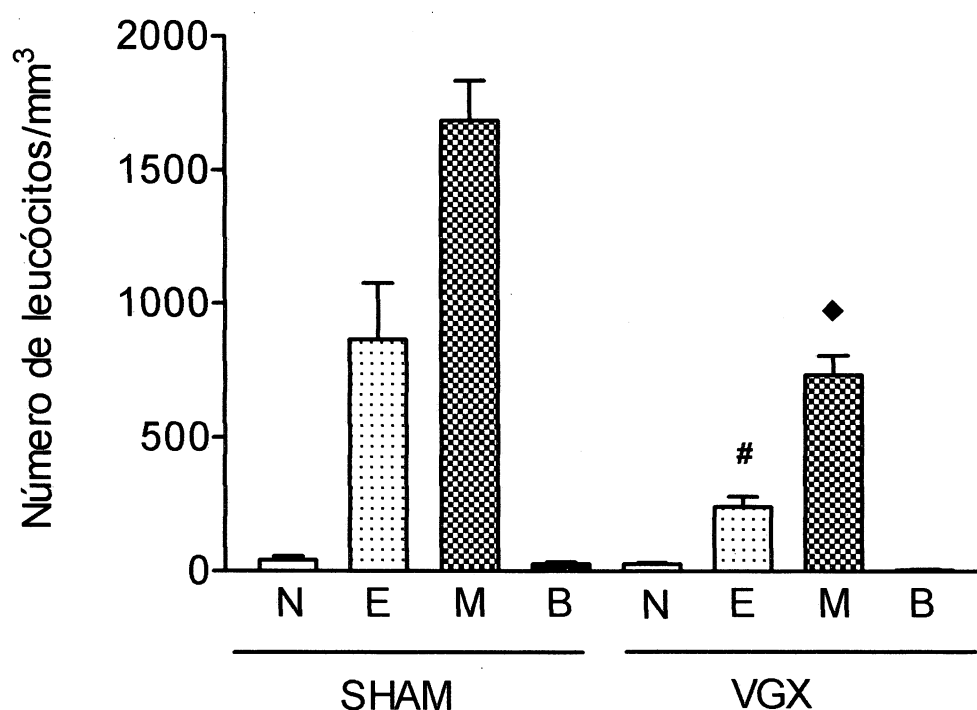
A viabilidade dos leucócitos presentes na cavidade peritoneal de animais falso-operados e VGX que não receberam estímulo inflamatório foi testada com Azul de Pontamina 1%. Não encontramos diferenças entre o número de células viáveis para os dois grupos (falso-operados: 88.0% e VGX: 84.3 % de células viáveis).

O número de leucócitos totais encontrados na cavidade peritoneal de animais VGX que não receberam qualquer estímulo, foi significativamente menor do que o observado no grupo falso-operado (SHAM:  $2616.67 \pm 306.78$ ; VGX:  $1011.11 \pm 103.00$  leucócitos) (FIG.13).

Ainda nestes animais, avaliamos o número diferencial dos leucócitos presentes no peritônio. Não encontramos diferenças em relação ao número de neutrófilos e basófilos, porém, verificamos uma diminuição de 71.9% de eosinófilos e de 56.0 % de mononucleares no grupo VGX (FIG. 14).



**FIG. 13:** Número de leucócitos totais residentes na cavidade peritoneal de animais falso-operados e VGX. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (n=6 – 9). # Diferença significativa em relação ao grupo falso-operado,  $P < 0,001$ .



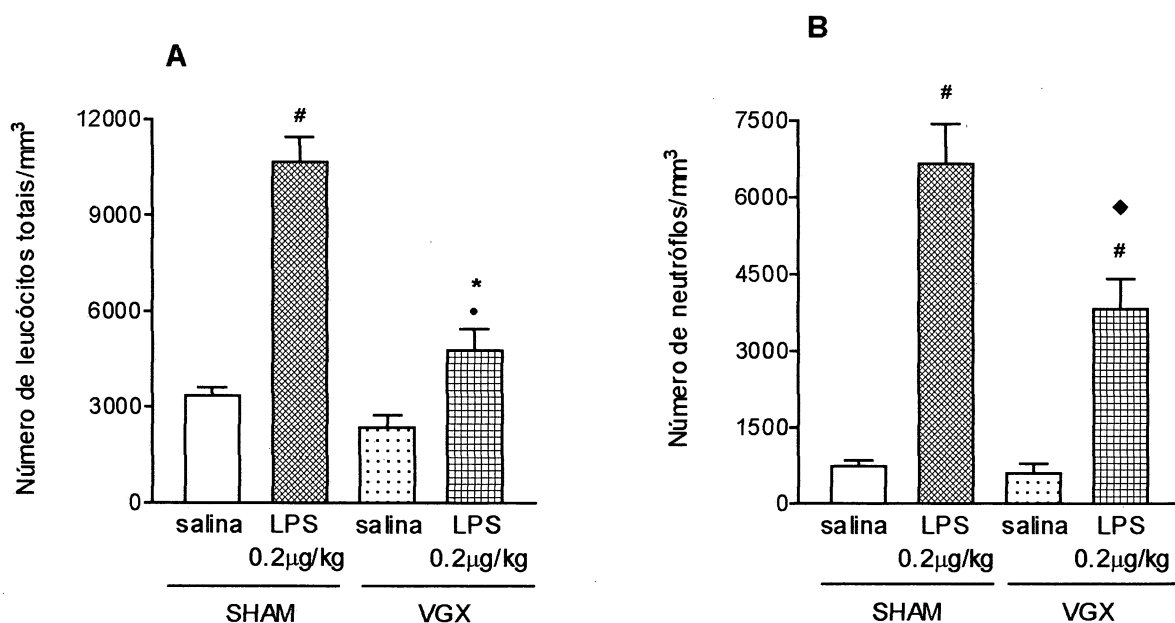
**FIG. 14:** Número de neutrófilos (N), eosinófilos (E), mononucleares (M) e basófilos (B) residentes na cavidade peritoneal de animais falso-operados e VGX. As barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos /mm<sup>3</sup> (n=6 - 9). # Diferença significativa em relação ao grupo E falso-operado,  $P < 0,001$ ; ♦ Diferença significativa em relação ao grupo M falso-operado,  $P < 0,001$ .



#### **4.8 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA EM RATOS VGX**

Ao avaliarmos a migração leucocitária, 3 horas após a administração da dose de LPS que causa essa resposta (0.2 µg/kg – ip), verificamos que o número de leucócitos totais que migraram para a cavidade peritoneal de ratos tratados com LPS somente aumentou nos animais falso-operados, quando comparados ao respectivo grupo salina (dados não mostrados). Observamos também um aumento na migração de neutrófilos induzida pelo LPS 0.2µg/kg, tanto no grupo falso-operados como no grupo VGX, de maneira similar ao observado anteriormente em animais não operados (FIG. 7 B). Quanto ao número de demais leucócitos encontrados na cavidade peritoneal, não encontramos diferenças no número de mononucleares, porém, observamos uma diminuição no número de eosinófilos no grupo VGX salina (apêndice 2).

A administração do LPS na dose de 0.2 µg/kg – ip aumentou significativamente a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal dos animais falso-operados e VGX 6 horas após a administração do estímulo, quando comparados aos respectivos grupos salina (FIG. 15 A). Este aumento deveu-se principalmente por um aumento na migração de neutrófilos, observado nos grupos falso-operados e VGX que receberam LPS (FIG. 15 B). Contudo, os animais VGX tratados com LPS apresentaram uma redução significativa no número de leucócitos totais que migraram para a cavidade peritoneal, quando comparados aos animais falso-operados que tiveram o mesmo tratamento (FIG. 15 A). Da mesma maneira, o número de neutrófilos encontrados na cavidade peritoneal de animais VGX que receberam LPS mostrou-se significativamente reduzido quando comparado ao grupo falso-operados que recebeu o mesmo estímulo (FIG. 15 B). O número de leucócitos mononucleares na cavidade peritoneal não foi diferente para os quatro grupos, contudo, observamos um aumento no número de eosinófilos para o grupo falso-operado que recebeu LPS (apêndice 2).

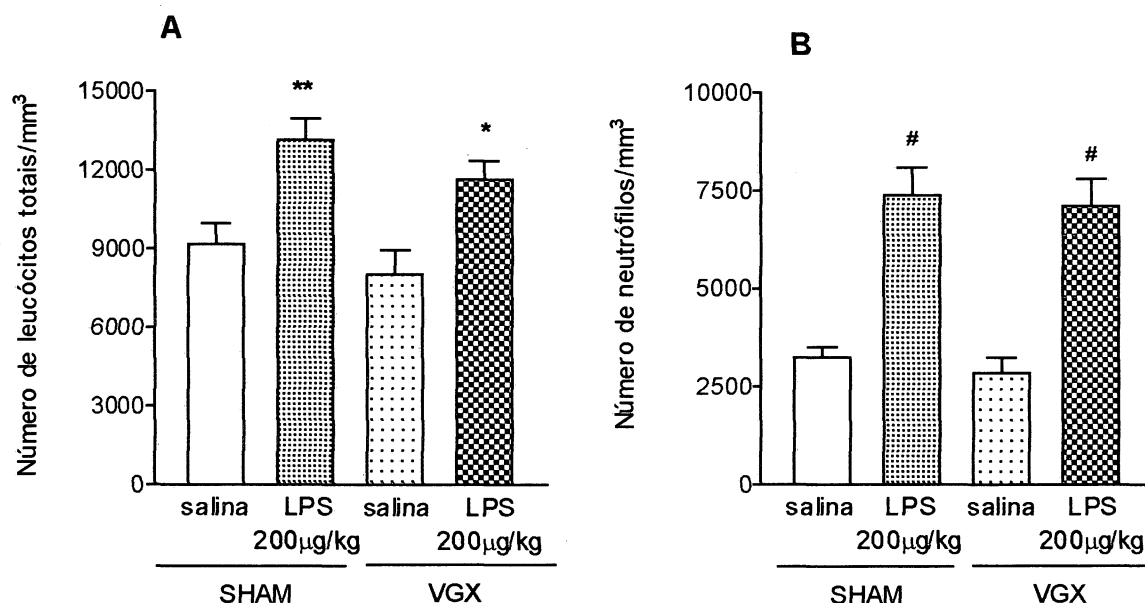


**FIG. 15:** Migração de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) para a cavidade peritoneal de ratos estimulados por LPS. Os animais receberam LPS na dose de 0.2 µg/kg ou salina estéril (1mL/200g), ambos por via ip e o número de células foi avaliado **6 horas** após os tratamentos. No painel A, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (n=5-11). No painel B, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/mm<sup>3</sup> (n=4-10). # Estatisticamente diferente dos respectivos grupos salina, P<0,001; ● Estatisticamente diferente do grupo SHAM LPS, P<0,001; \* Estatisticamente diferente do grupo VGX salina, P<0,05; ♦ Estatisticamente diferente do grupo SHAM LPS, P<0,01.

#### **4.9 AVALIAÇÃO DA LEUCOCITOSE EM RATOS VGX**

Quando o sangue foi coletado 3 horas após os tratamentos, não observamos alterações no número de leucócitos totais circulantes nos animais falso-operados e VGX que receberam LPS 200µg/kg (dados não mostrados), similarmente ao observado em animais não operados que receberam o mesmo tratamento (FIG. 9 A). O número de neutrófilos circulantes foi aumentado nos animais falso-operados e VGX tratados com LPS 200µg/kg, correspondendo ao observado em animais não operados (FIG. 9 B). Avaliamos o número de outros leucócitos circulantes e observamos uma diminuição de mononucleares nos dois grupos tratados com LPS, e não encontramos diferenças no número de eosinófilos nos animais (apêndice 2).

A administração de LPS na dose que causa leucocitose em ratos normais (200µg/kg – ip) também promoveu um aumento significativo no número de leucócitos totais circulantes em ratos falso-operados e VGX, comparados aos grupos salina, quando o sangue foi coletado 6 h após a administração dos estímulos (FIG. 16 A). Esta leucocitose deveu-se principalmente por neutrofilia, observada nos grupos falso-operados e VGX que receberam LPS 200µg/kg, quando comparados aos respectivos grupos salina (FIG. 16 B). Observamos monocitopenia apenas no grupo falso-operado tratado com LPS e não encontramos diferenças no número de eosinófilos circulantes nos animais (apêndice 2).



**FIG. 16:** Variação no número de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) circulantes induzidos por LPS em ratos SHAM e VGX. Salina estéril (1mL/200g) e LPS na dose de 200.0 µg/kg foram injetados via ip. nos ratos e as amostras de sangue foram coletadas após **6 horas**. No painel A, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais/mm<sup>3</sup> (n=26-14). No painel B, as barras representam a média  $\pm$  EPM do número de neutrófilos/mm<sup>3</sup> (n=12-21). \*\* Estatisticamente diferente do grupo SHAM salina,  $P < 0,01$ ; \* Estatisticamente diferente do grupo VGX salina,  $P < 0,05$ ; # Estatisticamente diferente dos respectivos grupos salina,  $P < 0,001$ .

## **5. DISCUSSÃO**

Na presença de um estímulo injuriante, macrófagos residentes são ativados e atuam como células de alarme, desencadeando mecanismos de defesa através da liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , LTB<sub>4</sub>, entre outros, que por sua vez, constituem o elo entre o desenvolvimento de manifestações locais (migração leucocitária) e sistêmicas (neutrofilia e febre). A ocorrência de tais eventos dependem da qualidade e da intensidade do estímulo injuriante.

Em nosso modelo experimental, a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal foi significativamente aumentada pelo LPS nas doses de 0.002 a 2.0  $\mu$ g/kg, atingindo o pico da resposta com a dose de 0.2 $\mu$ g/kg (FIG.1). Esse aumento foi ocasionado principalmente pela elevação da migração de neutrófilos (FIG.2). No entanto, as maiores doses do LPS (20 e 200 $\mu$ g/kg) promoveram uma diminuição significativa no número de leucócitos totais e de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal dos animais (FIGS. 1 e 2).

O número de leucócitos totais circulantes mostrou-se elevado quando os animais receberam LPS nas doses de 0.02 a 200.0 $\mu$ g/kg (FIG. 3). A leucocitose observada também deveu-se principalmente à neutrofilia, sendo que o pico da resposta deu-se com a dose de 200 $\mu$ g/kg (FIG.4).

Esses dados são corroborados pela literatura, particularmente a inibição da migração celular em doses mais altas de LPS (ROCHA e FERREIRA, 1986). Tanto na migração celular como na leucocitose, observamos um aumento no número de eosinófilos (apêndice 2). Contudo, não encontramos na literatura dados semelhantes que pudessem explicar tal ocorrência. Além disso, tal fenômeno foi pontual, o que sugere variações ao acaso. Esses resultados, juntamente com os de migração celular, foram obtidos colhendo o sangue e o fluido peritoneal 6 horas após os tratamentos.

Os dados relativos ao número de neutrófilos, em conjunto, mostram que a diminuição da migração destes leucócitos é acompanhada pelo aumento do número destes neutrófilos na circulação, quando da administração de altas doses do estímulo. Inicialmente, a administração do estímulo desencadeia a geração de fatores quimiotáticos locais, promovendo a migração de células do sangue para o

sítio inflamatório, conforme observado. No entanto, a medida que esta dose é aumentada (LPS 0.2µg/kg a 200 µg/kg, FIG.1), a migração de células para o sítio inflamatório diminui. É possível que esta diminuição do número de leucócitos no fluido peritoneal seja causada pela grande quantidade de mediadores inflamatórios gerados pelas doses mais altas de LPS. Neste sentido, o extravasamento destes mediadores em altas quantidades para a corrente sangüínea ou ainda do próprio LPS, desencadeariam uma resposta sistêmica, onde as células mobilizadas para realizar a defesa não reconhecem exatamente onde está localizado o sítio inflamatório, e permanecem na corrente sangüínea. Uma outra possibilidade, é que altas doses de LPS são capazes de ativar macrófagos a liberarem na circulação mediadores que inibem a migração de leucócitos para o foco inflamatório (CUNHA e cols., 1988). Apesar de no presente estudo não termos investigado este aspecto, é conhecido que o aumento de leucócitos circulantes durante a neutrofilia é seguido da diminuição do conjunto dessas células, na medula óssea (BOZZA e cols., 1994). Diversos autores tem reportado a capacidade de LPS em induzir febre e neutrofilia, fenômenos que fazem parte da RFA (PERRY e cols., 1957; RIETCHEL e cols., 1994; BOZZA e cols., 1994). Além disso, outros mediadores inflamatórios também podem induzir neutrofilia, quando liberados direta ou indiretamente após a administração sistêmica de LPS (ULICH e cols., 1986; ULICH e cols., 1987).

Outro fenômeno clássico apresentado durante a RFA é a resposta febril. Segundo DINARELLO e cols. (1988), a febre consiste na elevação controlada da temperatura interna de um organismo para níveis acima dos normais, decorrente de uma alteração do ponto de regulação hipotalâmico. Esta alteração ocorre quando PEx, como o LPS, estimulam macrófagos, leucócitos e demais células a sintetizar e liberar mediadores da resposta febril, denominados PE (FOREMAN, 1994).

Ao analisarmos a resposta febril, observamos que a dose maior de LPS (200 µg/kg) produziu uma significativa elevação de temperatura corporal que atingiu o seu ponto máximo na 4ª hora. A temperatura permaneceu aumentada até a 6ª hora após o tratamento (FIG.5). Por outro lado, a menor dose de LPS (0.2µg/kg) induziu uma resposta febril de menor magnitude nos animais, com pico máximo na 2,5 hora. Estes dados estão de acordo com KLUGER (1991) e ZAMPRONIO e cols. (1994),

que demonstraram que doses mais altas de LPS induzem uma febre potente e duradoura, produzida diretamente pela liberação de citocinas (PE), enquanto que doses mais baixas tendem a produzir uma resposta febril de curta duração.

Desta maneira, passamos a avaliar o curso temporal dos fenômenos de migração leucocitária e leucocitose, após o tratamento com LPS nas doses de 0.2 e 200.0  $\mu\text{g/kg}$ .

A injeção de LPS na dose de 0.2 $\mu\text{g/kg}$  aumentou significativamente a migração de leucócitos totais e posteriormente neutrófilos para a cavidade peritoneal já 1,5 hora após o tratamento (FIG. 6) e que se manteve na 3ª hora (FIG.7). Contudo, com a maior dose de LPS, o número de leucócitos totais não se mostrou diferente do controle (salina) tanto 1,5 como 3 horas após a administração do estímulo (FIGS. 6 e 7). Este fenômeno também havia sido observado na 6ª hora. Apesar de observarmos um pequeno aumento no número de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal dos animais, 3 horas após a administração de LPS na dose de 200.0 $\mu\text{g/kg}$  (FIG. 7 B), também verificamos uma redução significativa no número de leucócitos mononucleares (salina  $2305.2 \pm 144$  e LPS 200.0 $\mu\text{g/kg}$   $1300 \pm 110$ ). Estes dados indicam que a migração de neutrófilos pode ser detectada a partir de 1,5 hora após a administração da menor dose de LPS .

Embora a migração celular tenha se iniciado 1,5 hora após a administração do LPS, não observamos variação no número de leucócitos circulantes neste período (FIG. 8). Portanto, é possível que haja uma compensação dos neutrófilos que saem da corrente sangüínea para o sítio inflamatório com novas células que caíam na corrente sangüínea, ou seja, a leucocitose inicia-se neste período mas não pode ser detectada a menos que se avalie o conjunto de células da medula óssea. Entretanto, na 3ª hora foi possível detectar um aumento significativo no número de neutrófilos circulantes com ambas as doses de LPS (FIG. 9 B) e com a dose de 0.2 $\mu\text{g/kg}$ , somente o aumento do número de leucócitos totais circulantes (FIG. 9 A). O número total de leucócitos circulantes na dose de 200.0  $\mu\text{g/kg}$  de LPS não foi significativamente diferente do controle, pois paralelamente à migração de leucócitos totais, houve uma diminuição no número de mononucleares (salina:  $6359.2 \pm 515$ ; LPS 200 $\mu\text{g/kg}$ :  $3648.8 \pm 355$ ). Segundo van der POOL e cols. (1992),



o TNF- $\alpha$  pode promover neutrofilia, linfopenia e monocitopenia em humanos, e parte deste efeito se deve ao aumento dos níveis séricos de IL-6. MILLER e cols.(1997) demonstraram que os níveis destas citocinas estão aumentadas na circulação de ratos quando da administração de LPS. Porém, quanto aos dados envolvendo redução de mononucleares, não podemos afirmar se está ocorrendo uma linfopenia ou monocitopenia, pois não realizamos a diferenciação das células mononucleares entre linfócitos e monócitos. Assim como dito anteriormente, não atribuímos ao LPS o aumento de eosinófilos no exsudato peritoneal ou no sangue (apêndice 1). É importante salientar que a dose menor do estímulo (0.2 $\mu$ g/kg) promoveu maior neutrofilia na 3ª hora ( $6032.3 \pm 487.7$ ) do que na 6ª hora ( $5363.0 \pm 799.5$ ), enquanto que para a maior dose (200 $\mu$ g/kg), a neutrofilia aumentou em decorrência do tempo (1,5 h:  $2514.6 \pm 442.7$ ; 3 h:  $6347.7 \pm 516.9$ ; 6 h:  $10719.5 \pm 884.8$ ).

Quanto ao tempo para o aparecimento das respostas sistêmicas (febre e leucocitose), pudemos verificar que a resposta febril e a neutrofilia não são detectáveis 1,5 hora após a injeção dos estímulos, o que sugere um paralelismo nestas respostas e portanto uma relação entre os mediadores envolvidos (ULICH e cols., 1986; ULICH e cols., 1987a; ULICH e cols., 1987b; ULICH e cols., 1989a; KAJITA e HUGLI, 1990; HECHTMAN e cols., 1991; BERTINI e cols., 1993; KLOSTERHALFEN e cols., 1992; DALE 1989; GORDON, 1955; ULICH e cols., 1989).

Assim, os dados obtidos sugerem que, quando o estímulo é intenso, a quantidade de mediadores que atinge a circulação sangüínea desencadeia uma resposta sistêmica, a RFA, caracterizada pela febre e neutrofilia. Neste sentido, é possível que o próprio estímulo (LPS) tenha chegado à circulação sangüínea, e portanto, torna-se mais importante defender o organismo como um todo, não havendo mais a necessidade da resposta local (migração celular). Ainda, observando de outro ângulo, se o estímulo é de baixa intensidade (LPS 0.2  $\mu$ g/kg), por que desencadear uma resposta sistêmica de febre e leucocitose (que possui sua contrapartida de prejuízo), se a questão pode ser resolvida localmente?

Alguns autores já demonstraram que a vagotomia subdiafragmática é capaz de bloquear fenômenos comportamentais relacionados à doença (WATKINS e cols.,

1995a; WATKINS e cols., 1995b; GOEHLER e cols., 1995; FLESHNER e cols., 1995). Nosso estudo buscou não focalizar fenômenos comportamentais, mas as respostas inflamatória e de fase aguda em animais VGX.

Vários estudos demonstram que animais submetidos à vagotomia subdiafragmática não apresentam febre (OPP e cols., 1997; ROMANOVSKY e cols., 1997 a,b; WATKINS e cols., 1995 a,b). Essa ausência da resposta febril está relacionada à deficiência da transdução de sinais pirogênicos da cavidade abdominal ao cérebro, excluindo portanto fenômenos de incompetência termorregulatória, desnutrição, tolerância ao LPS, entre outros (ROMANOVSKY e cols., 1997a; ROMANOVSKY e cols., 1997b). Assim como em outros estudos, os animais submetidos a vagotomia subdiafragmática utilizados nessa investigação receberam uma dieta calórica complementar à ração, garantindo a ausência de desnutrição. Da mesma maneira que ROMANOVSKY e cols. (1997b), utilizamos como comprovação da efetividade da cirurgia de vagotomia subdiafragmática, a pesagem e comparação dos pesos absolutos dos estômagos, significativamente maiores em animais VGX (FIG. 10).

Nossos estudos confirmam os dados acima. A resposta febril induzida pela maior dose de LPS (200.0 µg/kg - ip) foi significativamente reduzida em animais VGX, comparado aos animais falso-operados (FIG. 12). Embora a menor dose de LPS (0.2 µg/kg - ip) tenha elevado a temperatura corporal com menor intensidade, essa elevação mostrou-se também reduzida em animais VGX (FIG. 11).

GOLDBACH e cols. (1997) observaram que cobaias VGX que receberam LPS pela via intramuscular apresentaram febre, enquanto que aquelas que receberam LPS pela via intraperitoneal, não apresentaram febre, ou seja, quando o estímulo é administrado pela via ip, a vagotomia reduz a febre induzida pelo LPS. Portanto, os animais VGX não só são capazes de responder à variações de temperatura ambiente como também podem desenvolver febre, desde que o estímulo seja administrado em outro local que não o desnervado.

WATKINS e cols. (1995a) sugeriram que o nervo vago seria uma via de transdução de sinais pirogênicos vindos da periferia ao cérebro, levantando a hipótese de uma participação importante do fígado na gênese da resposta febril,

como um sítio de processamento de PE e PEx, uma vez que citocinas pirogênicas, como IL-1, podem ser originadas nas células de Kupffer do fígado, ligando-se a seus respectivos receptores do ramo vagal hepático. Além disso, injeções intravenosas de IL-1 $\beta$  na veia porta-hepática promoveram um aumento na velocidade de descarga de aferentes vagais (NIIJIMA, 1996). GOEHLER e cols. (1994) demonstraram ainda que o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1 RA) pode ligar-se a ramos hepáticos do nervo vago, sugerindo a existência de sensores para IL-1 $\beta$  ou para algum mediador gerado por esta citocina capaz de enviar informações para o SNC através do ramo vagal hepático. Corroborando a participação do fígado, já foi demonstrado que a vagotomia seletiva do ramo hepático vagal é a responsável pela ausência da resposta febril (SIMONS e cols, 1988), sugerindo portanto, o envolvimento desse órgão na patogênese da febre (DINARELLO e cols., 1968).

Atualmente, existem estudos que procuram investigar a participação de outros nervos aferentes que estejam envolvidos com a resposta febril. ROTH e cols. (1999) mostraram que a geração de febre através da injeção de baixas doses de LPS em uma câmara subcutânea implantada no dorso do animal pode ser bloqueada através da anestesia local com ropivacaina, sugerindo que neste caso, a resposta febril possa ser mediada por aferentes cutâneos.

Essas observações reforçam a hipótese de que os sinais gerados periféricamente na resposta inflamatória podem ser enviados ao SNC, através de estímulos nervosos.

São vários os estudos que indicam a participação de aferentes vagais na resposta febril, no entanto, até o momento, não existiam dados que avaliassem a integridade de fenômenos periféricos que ocorriam concomitantemente a estes fenômenos centrais em animais submetidos à vagotomia. Neste sentido, inicialmente propusemo-nos a avaliar a integridade de células residentes na cavidade peritoneal de animais VGX.

A avaliação da viabilidade dos leucócitos de animais que não receberam LPS permitiu observar a quantidade de células residentes vivas nos grupos falso-operados e VGX. Os dados obtidos apontam para uma similaridade entre o número de leucócitos viáveis para ambos os grupos, indicando que, através deste método, a

vagotomia subdiafragmática não altere a viabilidade de células residentes. No entanto, observamos que, animais submetidos à vagotomia subdiafragmática possuem uma quantidade menor de leucócitos totais residentes que os animais falso-operados (FIG. 13), e mais ainda, que a diminuição destas células está relacionada à diminuição de eosinófilos e mononucleares (FIG. 14). É possível que a diminuição de leucócitos peritoneais seja decorrente de algum efeito direto da ausência do nervo vago, alterando então o número destas células no peritônio, ou seja, a integridade do nervo é essencial para assegurar o número de células residentes no peritônio. O método disponível para avaliação da viabilidade celular, no entanto, não foi o mais adequado, uma vez que se baseia simplesmente no fato destas células estarem vivas ou não. Ainda, existe a possibilidade que, além do número reduzido, estas células estejam com seu metabolismo alterado. Um método de avaliação mais preciso seria a avaliação da viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-(4, 5 - dimetiltiazol -2 -il)-2,5 - difeniltetrazólico) (MOSMANN, 1983; TADA e cols, 1986). Este método baseia-se no princípio de que este sal, o MTT, é clivado pelas enzimas mitocondriais de células viáveis, resultando em um precipitado, chamado de formazan. Este precipitado é então dissolvido, e sua quantificação pode ser feita por espectrofotometria.

Embora uma avaliação qualitativa mais adequada destas células não tenha sido possível, a variação no número de células residentes sugeriu-nos possíveis variações nas respostas de migração celular e leucocitose em animais VGX.

No período de 3 horas após a administração da dose de LPS que causa migração leucocitária (0.2 µg/kg), o número de leucócitos totais que migraram para a cavidade peritoneal mostrou-se significativamente aumentado somente nos animais do grupo falso-operado que receberam o estímulo, mas não no grupo VGX. Contudo, observamos migração de neutrófilos induzida pelo LPS 0.2 µg/kg, em ambos os grupos, porém, esta resposta foi mais evidente nos animais falso-operado do que nos animais VGX, possivelmente pela diminuição de mononucleares residentes em animais VGX (apêndice 2).

Já na 6h após os tratamentos, a administração do LPS 0.2 µg/kg-ip aumentou a migração de leucócitos totais (FIG. 15 A), especificamente neutrófilos (FIG. 15 B),

para o sítio inflamatório, tanto em animais falso-operados como em animais VGX. Porém, observamos que esse aumento na migração de leucócitos totais foi significativamente menor em animais VGX (FIG. 15 A). Da mesma maneira, a migração de neutrófilos obtida em animais VGX foi significativamente menor do que a encontrada nos animais falso-operados (FIG. 15 B). Esses resultados nos permitem sugerir, como era esperado, que a ausência do nervo vago está afetando a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos VGX, e que esta diminuição é decorrente da redução de cerca de 50% do número de mononucleares residentes nesses animais (FIG.14). Já foi demonstrada, em várias espécies animais, a importância da população de macrófagos residentes em gerar fatores quimiotáticos para direcionar o movimento dos neutrófilos ao sítio inflamatório (RUSSO, 1980; SOUZA e cols., 1985; CUNHA e cols., 1990). Portanto, a vagotomia subdiafragmática, reduzindo a quantidade de células residentes, está acarretando em uma menor migração de neutrófilos ao foco inflamatório. Ainda não podemos descartar a hipótese de que a ausência do nervo vago interfira também na qualidade dos mediadores gerados durante o processo inflamatório, e dessa maneira, prejudique a migração celular.

O número de leucócitos circulantes totais, 3 horas após a administração de LPS (200.0 µg/kg - ip), não foi alterado em animais VGX ou falso-operados quando comparados aos respectivos controles. Porém, observamos significativa neutrofilia tanto nos animais falso-operados como nos VGX que receberam o LPS (apêndice 2). Este resultado, inalteração do número de leucócitos circulantes totais, mesmo havendo uma neutrofilia, foi similar ao obtido em animais não operados (FIG. 9) e se deve essencialmente a uma compensação do aumento do número de neutrófilos com uma diminuição no número de mononucleares, como descrito anteriormente em animais normais.

Quando o sangue foi coletado 6 horas após a administração do LPS 200.0 µg/kg - ip, o número de leucócitos totais e de neutrófilos foi significativamente aumentado tanto em animais falso-operados quanto em animais VGX (FIG. 16), não havendo diferença entre os grupos falso-operados e VGX que receberam LPS. Possivelmente, altas doses de LPS acarretam em um extravasamento de

mediadores para outros sítios, provocando uma ativação generalizada de células, e deste modo, não encontramos diferenças na leucocitose de animais VGX e falso-operados (FIG. 16). Assim, nesta alta dose do estímulo, se houver uma diminuição de atividade de células residentes decorrente da vagotomia, esta se daria essencialmente nas células do peritônio. A ativação de células presentes em outros sítios compensaria esta deficiência, o que resultaria na leucocitose similar em animais VGX e falso-operados. É possível que em doses menores de LPS, este efeito compensatório não seja evidente e possamos identificar variações na leucocitose entre animais VGX e falso-operados.

Assim, mesmo reduzindo a migração celular, a vagotomia subdiafragmática não foi capaz de modificar a leucocitose. Estes dados sugerem que, quando altas doses de LPS são administradas, a quantidade de mediadores circulantes não está modificada, uma vez que a leucocitose continua inalterada. Desta maneira, se a resposta febril dependesse única e exclusivamente dos mediadores presentes na corrente sangüínea, seria possível que, com altas doses de LPS, esta resposta também não fosse alterada. No entanto, observamos que mesmo utilizando uma dose alta de LPS (200 µg/kg), a resposta febril não ocorre em animais VGX. Nossos dados, portanto, adicionam uma evidência contundente: o nervo vago é importante, se não essencial, na comunicação do sítio inflamatório com o SNC.

Outra possibilidade é que a vagotomia esteja alterando a qualidade dos mediadores liberados pelas células residentes. Assim, os mediadores importantes para a leucocitose, estão inalterados em animais VGX, enquanto aqueles que são responsáveis pela resposta febril, estão sendo produzidos em menor quantidade. Entretanto, é essencial salientar que não são conhecidos mediadores que sejam importantes na leucocitose mas não na febre, embora eles possam existir.

Ainda seria interessante investigar a transmissão da resposta febril em animais VGX, utilizando o sobrenadante de macrófagos de animais normais estimulados com LPS, pois através desse método, poderíamos observar se macrófagos de animais normais liberam substâncias capazes de induzir febre em animais VGX. Por outro lado, existe ainda a possibilidade de investigarmos se macrófagos obtidos de animais VGX são capazes de produzir mediadores em

quantidade e qualidade suficientes para promover febre em animais normais (ZAMPRONIO e cols., 1994 a).

Portanto, os resultados obtidos nos permitem confirmar a importância da comunicação através de aferentes periféricos entre o sistema mononuclear fagocitário e o SNC. Sugerimos ainda que o SNC pode exercer uma função importante na manutenção da atividade de células residentes responsáveis pelo patrulhamento do organismo contra distúrbios em sua homeostase.

## **6. CONCLUSÃO**



Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- Neste estudo, a resposta inflamatória local, representada pela migração de leucócitos totais e principalmente neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos normais, foi aumentada após a administração de doses mais baixas do LPS, ou ainda reduzida, quando da administração de altas doses do estímulo. O pico da resposta foi observado com LPS na dose de 0.2  $\mu\text{g/kg}$ .
- A leucocitose e neutrofilia, fenômenos da RFA, foram aumentadas quando da administração do LPS nas doses de 0.02 a 200.0  $\mu\text{g/kg}$ , sendo que as respostas máximas foram observadas com LPS na dose de 200.0  $\mu\text{g/kg}$ , em ratos normais.
- A resposta febril, outro componente da RFA, foi observada com as duas doses de LPS em animais normais, embora a maior dose do estímulo (200.0  $\mu\text{g/kg}$ ) tenha promovido uma febre mais potente e duradoura.
- Quanto ao curso temporal para o aparecimento dos fenômenos estudados, verificamos que a migração de células para a cavidade peritoneal inicia-se a partir de 1,5 hora após a administração de LPS. Por outro lado, as respostas sistêmicas como febre e leucocitose (neutrofilia) são detectadas a partir da 3ª hora, e permanecem até a 6ª hora após a administração do estímulo, sugerindo um paralelismo nestas respostas, e portanto, uma relação entre os mediadores envolvidos.
- A resposta febril induzida pelas duas doses de LPS (0.2 e 200.0  $\mu\text{g/kg}$ ) mostrou-se significativamente reduzida em ratos VGX, indicando que o nervo vago participa da gênese da resposta febril, quando o estímulo é administrado no local desnervado, reforçando a hipótese da participação de nervos aferentes periféricos na comunicação entre o sistema imune e o SNC, através dos sinais gerados perifericamente durante a RFA.
- Aparentemente, a viabilidade das células residentes peritoneais em animais VGX não difere da observada em animais falso-operados. No entanto, a ausência do

nervo vago parece promover algum efeito direto sobre estas células residentes, através da diminuição do número de leucócitos peritoneais, principalmente eosinófilos e mononucleares, em animais VGX.

- A migração de leucócitos totais e neutrófilos, induzidas pelo LPS 0.2 µg/kg , foi significativamente menor nos animais VGX do que nos animais falso-operados. Possivelmente a vagotomia subdiafragmática esteja afetando a migração leucocitária devido a diminuição de aproximadamente 50% dos leucócitos mononucleares peritoneais. Sugerimos portanto, a importância da comunicação entre o sistema fagocitário mononuclear e o SNC, através de aferentes periféricos vagais.
- Não encontramos diferenças na leucocitose e neutrofilia induzidas pelo LPS 200.0 µg/kg entre animais VGX e falso operados, possivelmente devido a uma ativação de células presentes em vários sítios, decorrente da alta dose do estímulo. É possível que em doses mais baixas, como LPS 0.2 µg/kg, este efeito compensatório não seja evidente e possamos identificar variações na leucocitose entre animais VGX e falso-operados.

## **7. APÊNDICE**

7.1) Apêndice 1

Preparo das soluções:

I) Solução de Salina Tamponada (PBS)

NaCl (Synth).....	80,0 g
KCl (Merck).....	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12 H <sub>2</sub> O (Nuclear).....	28,9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Cetus).....	2,0 g
Água deionizada.....q.s.	1,0 L

II) Solução de Albumina Bovina 3%

Albumina (Reagen).....	3,0 g
Salina Tamponada.....q.s.	100,0 mL

III) Líquido de Turk

Azul de metileno a 2% (Merck).....	0,2 mL
Ácido Acético Glacial. (Reagen).....	15,0 mL
Água deionizada.....q.s.	485,0 mL

IV) Corante Pancrômico de Rosenfeld

Giemsa (Vetec).....	0,97 g
May-Gronwald (Vetec).....	0,53 g
Metanol P. A.(Merck).....q.s.	1,0 L

IV) Azul de Pontamina 1%

Azul de Pontamina (Merck)..... 1,0 g  
Salina estéril.....q.s. 100,0 mL

7.2) Apêndice 2

Valores obtidos na diferenciação celular para migração leucocitária e leucocitose em animais normais (não operados).

7.2.1) *Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 1,5h*

I) Migração leucocitária

NEUTRÓFILOS	média	EPM	n
salina	381.9	58.4	10
LPS 0.2µg/kg	4157.1	539.9	6
LPS 200µ/kg	1029.1	130.2	11

EOSINÓFILOS	média	EPM	n
salina	238.9	48.1	11
LPS 0.2µg/kg	574.2	118	6
LPS 200µ/kg	344.2	52.2	11

MONONUCLEARES	média	EPM	n
salina	1475.1	145.1	11
LPS 0.2µg/kg	1577.1	176.3	6
LPS 200µ/kg	1559.6	144.8	8

II) Leucocitose

NEUTRÓFILOS	média	EPM	n
salina	2478.3	350.6	9
LPS 0.2µg/kg	3073.0	468.6	6
LPS 200µ/kg	2514.6	442.7	8

EOSINÓFILOS	média	EPM	n
salina	200.9	66.1	9
LPS 0.2µg/kg	574.2	118.0	6
LPS 200µ/kg	241.9	96.8	8

MONONUCLEARES	média	EPM	n
salina	9865.7	1179.9	9
LPS 0.2µg/kg	8438.5	708.1	6
LPS 200µ/kg	6903.0	1417.9	8

7.2.2) *Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 3h*

I) Migração leucocitária

NEUTRÓFILOS	média	EPM	n
salina	319.5	60.2	9
LPS 0.2µg/kg	3581.4	428.5	10
LPS 200µ/kg	1778.4	138.5	7

EOSINÓFILOS	média	EPM	n
salina	417.8	93.1	12
LPS 0.2µg/kg	820.2	111.7	10
LPS 200µ/kg	752.5	69.5	10

MONONUCLEARES	média	EPM	n
salina	2305.2	144.4	12
LPS 0.2µg/kg	1928.5	194.6	10
LPS 200µ/kg	1300.3	110.4	10

## II) Leucocitose

NEUTRÓFILOS	média	EPM	n
salina	2814.3	391.6	12
LPS 0.2µg/kg	6032.3	487.7	10
LPS 200µ/kg	6347.7	516.9	11

EOSINÓFILOS	média	EPM	n
salina	209.8	69.2	12
LPS 0.2µg/kg	115.9	54.6	10
LPS 200µ/kg	112.5	26.4	11

MONONUCLEARES	média	EPM	n
salina	6359.3	515.5	12
LPS 0.2µg/kg	6791.8	622.5	10
LPS 200µ/kg	3648.8	355.4	11

### 7.2.3) *Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 6h*

#### I) Migração leucocitária

NEUTRÓFILOS	média	EPM	n
salina	512.7	74.6	12
LPS 0.002µg/kg	3285.2	473.5	8
LPS 0.02µg/kg	2696.0	376.6	11
LPS 0.2µg/kg	3460.3	464.3	12
LPS 2.0µg/kg	3603.2	439.1	9
LPS 20.0µg/kg	2531.7	393.4	11
LPS 200µ/kg	2165.2	611.6	10

<b>EOSINÓFILOS</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
salina	948.9	117.9	19
LPS 0.002µg/kg	1037.0	180.4	12
LPS 0.02µg/kg	1444.6	199.4	11
LPS 0.2µg/kg	1291.6	271.1	12
LPS 2.0µg/kg	1808.4	317.4	9
LPS 20.0µg/kg	1523.7	206.4	11
LPS 200µ/kg	1383.1	214.3	10

<b>MONONUCLEARES</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
salina	2501.4	252.7	19
LPS 0.002µg/kg	2342.7	256.5	10
LPS 0.02µg/kg	3284.6	277.1	11
LPS 0.2µg/kg	2973.1	411.5	12
LPS 2.0µg/kg	2933.5	518.5	10
LPS 20.0µg/kg	1871.8	262.6	11
LPS 200µ/kg	1879.2	416.6	10

## II) Leucocitose

<b>NEUTRÓFILOS</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
salina	3236.6	311.2	16
LPS 0.002µg/kg	4858.0	805.6	10
LPS 0.02µg/kg	5932.8	830.2	10
LPS 0.2µg/kg	5363.0	799.5	11
LPS 2.0µg/kg	7812.2	512.3	9
LPS 20.0µg/kg	8795.6	631.8	8
LPS 200µ/kg	10719.5	884.8	8

<b>EOSINÓFILOS</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
salina	503.9	120.0	17
LPS 0.002µg/kg	491.3	155.1	10
LPS 0.02µg/kg	1608.4	558.7	11
LPS 0.2µg/kg	812.5	185.1	11
LPS 2.0µg/kg	629.9	221.1	11
LPS 20.0µg/kg	392.1	212.8	9
LPS 200µ/kg	932.0	349.8	8



<b>MONONUCLEARES</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
salina	7421.3	932.4	18
LPS 0.002µg/kg	5480.0	800.6	10
LPS 0.02µg/kg	8776.4	967.2	12
LPS 0.2µg/kg	6220.5	924.9	10
LPS 2.0µg/kg	5458.7	591.0	11
LPS 20.0µg/kg	5374.6	529.5	9
LPS 200µg/kg	5048.5	363.1	8

Valores obtidos na diferenciação celular para migração leucocitária e leucocitose em animais SHAM e VGX:

#### **7.2.4) Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 3h**

##### **I) Migração leucocitária**

<b>NEUTRÓFILOS</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
SHAM salina	787.9	241.0	5
SHAM LPS 0.2µg/kg	4167.9	589.5	7
VGX salina	475.9	150.9	7
VGX LPS 0.2µg/kg	2909.6	644.8	5

<b>EOSINÓFILOS</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
SHAM salina	691.3	223.9	6
SHAM LPS 0.2µg/kg	513.2	69.4	6
VGX salina	171.6	98.1	4
VGX LPS 0.2µg/kg	191.3	91.9	3

<b>MONONUCLEARES</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
SHAM salina	2394.3	490.3	6
SHAM LPS 0.2µg/kg	1904.6	357.9	7
VGX salina	1744.4	304.7	7
VGX LPS 0.2µg/kg	1365.6	119.3	5

## II) Leucocitose

NEUTRÓFILOS	média	EPM	n
SHAM salina	3708.3	894.5	6
SHAM LPS 200µg/kg	7714.8	603.9	8
VGX salina	4178.7	658.3	7
VGX LPS 200µg/kg	7660.6	1316.8	7

EOSINÓFILOS	média	EPM	n
SHAM salina	303.0	93.0	4
SHAM LPS 200µg/kg	-	-	-
VGX salina	140.7	15.1	3
VGX LPS 200µg/kg	275.3	152.9	3

MONONUCLEARES	média	EPM	n
SHAM salina	10818.4	1531.9	5
SHAM LPS 200µg/kg	4435.3	479.4	8
VGX salina	9469.3	478.5	6
VGX LPS 200µg/kg	3896.0	783.1	7

### 7.2.5) Tempo de colheita do fluido peritoneal e do sangue em 6h

#### I) Migração leucocitária

NEUTRÓFILOS	média	EPM	n
SHAM salina	731.9	110.3	10
SHAM LPS 0.2µg/kg	6657.4	785.7	6
VGX salina	595.8	188.0	5
VGX LPS 0.2µg/kg	3812.1	599.8	4

EOSINÓFILOS	média	EPM	n
SHAM salina	614.6	86.2	20
SHAM LPS 0.2µg/kg	1133.0	115.3	6
VGX salina	432.9	126.9	10
VGX LPS 0.2µg/kg	390.9	66.0	4

<b>MONONUCLEARES</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
SHAM salina	2461.6	208.4	10
SHAM LPS 0.2µg/kg	2584.6	164.5	6
VGX salina	1753.7	368.1	5
VGX LPS 0.2µg/kg	1722.0	151.1	4

## II) Leucocitose

<b>NEUTRÓFILOS</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
SHAM salina	3231.5	265.0	20
SHAM LPS 200µg/kg	7381.1	722.9	22
VGX salina	2838.5	391.4	12
VGX LPS 200µg/kg	7117.3	699.4	21

<b>EOSINÓFILOS</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
SHAM salina	392.7	68.7	12
SHAM LPS 200µg/kg	306.4	57.1	14
VGX salina	348.5	72.6	8
VGX LPS 200µg/kg	410.3	54.3	17

<b>MONONUCLEARES</b>	<b>média</b>	<b>EPM</b>	<b>n</b>
SHAM salina	7143.8	924.1	13
SHAM LPS 200µg/kg	4631.8	468.7	18
VGX salina	5306.6	717.5	10
VGX LPS 200µg/kg	4172.4	467.2	18

## **8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBELDA, S.M. e BUCK, C.A. Integrins an other cell adhesion molecules. FASEB J., v. 4, p. 2868-80, 1990.
- ALBELDA, S.M.; SMITH, C.W., Ward, P.A. Adhesion molecules and inflammatory injury. FASEB J., v. 8, p. 504-12, 1994.
- ALTENBURG, S. P.; MARTINS, M.A; SILVA, A. R.; CORDEIRO, R.S.B. e CASTRO-FARIA-NETO, H. C. LPS-induced blood neutrophilia is inibited by  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists: a role for catecholamines. J. of Leuk. Biol., v. 61, p.689-694, 1997.
- ATKINS, E. pathogenesis of fever. Physiol. Rev., v.40, n.3, p.580-646, 1960.
- BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines. Adv Immunol, p.55:97-179, 1994.
- BAN, E.; MILON, G.; PRUDHOME, N.; FILION, G.e HAOUR, F. Receptors for interleukin-1 (alpha and beta) in mouse brain: mapping and neuronal localization in hippocampus. Neurosciense, v.43, p.21-30, 1991.
- BANKS, W. A., ORTIZ, L.; PLOTKIN, S.R. e KASTIN, A.J. Human interleukin (IL)-1 $\alpha$ , murine IL-1 $\beta$  are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 259, p.988-996, 1991.
- BERKENBOSCH, F.; VAM DAM, A.M.; DERIJK, R.H. e SCHOTANUS, K. Role of the immune hormone interleukin-1 in brain adaptative responses to infection. In: Stress: Neuroendocrine and Molecular Approaches, edited by Kvetnanskey, R. S. A.; MacCarty, R. & Axelrod, j. New York: Gordon and Breach, p. 623-640, 1992.
- BERTINI, R. S.; GARANTINI, S.; DELGADO, R.; GHEZZI, P. Pharmacological activities of chlorpromazine involved in the inhibition of tumor necrosis factor production in vivo in mice. Immunol., n.79, p.217-9, 1993.
- BLATTEIS, C.M. e SEHIC, E. Fever: How many circulating pyrogens signal the brain? News Physiol. Sci., v.12, p.1-9, 1997.
- BLATTEIS, C.M.; BEALER, S. L.; HUNTER, W.S.; LLNOS, Q.-J.; AROKAS, R.A.; MASHBURNE, T.A.J. Supression of fever after lesions of the antroventral third ventricle in guinea pigs. Brian Res. Bull., v.11, p.519-26, 1983.
- BLIGH, J. The central neurology of mammalian thermoregulation. Neurosciense, v.4, p. 1213-1236, 1979.
- BLUTHÉ, R.M.; MICHAUD, KELLEY, K.We& DANTZER,R. Vagotomy attenuates behavioral effectes of interleukin-1 injected peripherally but not centrally. Neuroreport, v.7, p.1485-1488, 1996.

- BONE, R.C. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response system: what we do and do not know about cytokine regulation. Crit. Care Med., n.24, p.163-72, 1996.
- BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; SILVA, A. R.; LARANGEIRA, A. P.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M. A.; CORDEIRO, R.S.B. Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. Eur. J. Pharmacol., n.270, p.143-9, 1994.
- BUTCHER, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. Cell, n.67, p.1033-6, 1991.
- CALDWELL, F.T.; GRAVES, D.B. e WALLACE, B.H. Humoral versus neural pathways for fever production in rats after administration of lipopolysaccharide. J. Trauma, v. 47, p. 120-29, 1999.
- CARLOS, T.M. e HARLAN, J.M. Blood, n.7, p.2068-2101, 1994.
- CHAI, Z.; GATTI, S.; TONIATTI, C.; POLI, V. e BARTFAI, T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 $\beta$ : a study on IL-6 deficient mice. J. Exp. Med. v.183, p.311-16, 1996.
- COELHO, M.M.; LUHESHI, G.; HOPKINS, S.J.; PELÁ, I.R. e ROTHWELL, N.J. Multiple mechanisms mediate antipyretic action of glucocorticoids. Am. J. Physiol. v.269, p.R527-35, 1995.
- COELHO, M.M.; SOUZA, G.E.P. e PELÁ, I.R. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. Am. J. Physiol. v.263, p.R423-27, 1992.
- COOPER, A.L.; BROUWER, S.; TURNBULL, A.V.; LUHESHI, G.N.; HOPKINS, S.J.; KUNKEL, S.L. e ROTHWELL, N.J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and fever after peripheral inflammation in the rat. Am. J. Physiol., v.267, p. R1431-36, 1994.
- CRONSTEIN, B.N. e WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. Arthritis and Rheumatism, v.136, n.2, p.147-57, 1993.
- CUNHA, F.Q. e FERREIRA, S.H. The release of neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. Eur. J. Pharmacol., v.129, p.65-76, 1986.
- CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R. A.; FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.P. e FERREIRA, S.H. Macrophages stimulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an vivo demonstration. Brazilian J. Med. Biol. Res., v.19, p.775-7, 1986.

- CUNHA, F.Q.; SOUZA, G.E.P.; SOUZA, C.A. M.; CERQUEIRA, B. C. S. e FERREIRA, S.H. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS- stimulated macrophages . Br. J. Exp. Path. , K41, 1988.
- CYBULSKY, M.I.; COLDITZ, I.G.; MOVAT, H.Z. The role of interleukin-1 in neutrophil leucocyte emigration induced by endotoxin. Am. J. Pathol., v.124, p.367-72, 1986.
- D'ÓRIO, V.; WAHLEN, C.; RODRIGUEZ, L.M.; FOSSION, A.; JUCHMES, J.; HALLEUX, J. e MARCELLE, R. A comparison of *Escherichia coli* endotoxin single bolus injection with low-dose endotoxin infusion on pulmonary and systemic vascular changes. Circ. Shock 21: 207-216, 1987.
- DALE, M.M.; Leucocytosis. In *Textbook of Immunopharmacology* (DALE, M.M. and FOREMAN, J.C., eds.), New York: Blackwell Scientific, p.232-41, 1989.
- DAVATELIS, G.; WOLPE, S.D.; SHERRY, B.; DAYER, J.-M.; CHICHEPORTICHE, R. e CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. Science, v.243, p.1066-68, 1989.
- DAVIES, M.G. e HAGEN, P.O. Systemic inflammatory response syndrome. British J. of Surgery, v. 84, p. 920-35, 1997.
- DERIJK, R.H.; STRIJBOS, P.J.L.M.; ROOIJEN, N.V.; ROTHWELL, N.J.; BERKENBOSCH, F. Fever and thermogenesis in response to bacterial endotoxin involve macrophage-dependent mechanisms in rats. A. Physiol. Sci., R1179-R1183, 1993.
- DIAS-BARUFFI, M.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; ROQUE BARREIRA, M.C. Macrophage-released neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. Agents and Actions, v.38, p. C54-C56, 1993.
- DINARELLO, C.A. Interleukin 1. Rev. Infect. Dis., v.6, n.1, p.51-95, 1984.
- DINARELLO, C.A.; BERNHEIN, H.A.; DUFF, G.W.; HELE, H.V.; NAGABHUSHAN, T.L.; HAMILTON, N.C.; COCEANI, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. J. Clin. Invest., v.74, p.906-13, 1984a.
- DINARELLO, C.A.; BODEL, P. T. e ATKINS, E. The role of the liver in the production of fever and in pyrogenic tolerance. Trans. Assoc. Am. Physicians 81: 334-44, 1968.
- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M. New concepts on the pathogenesis of fever. Rev. Infect. Dis., v.10, n.1, p.168-89, 1988.

- DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.; BEAUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A.Jr.; O'CONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. J. Exp. Med., v.163, p.1433-50, 1986.
- DUNN, A.J. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. Pharmacol. Exp. Ther., n.26, p.964-69, 1992.
- ELLIOTT, G.T.; WELTY, D. e KUO, Y.D. The D-galactosamine loaded mouse and its enhanced sensitivity to lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A: a role for superoxide. J. Immunother. 10: 69-74, 1991.
- ELLIS, H. e PRYSE-DAVIES, J. Vagotomy in the rat: a study of its effect on stomach and small intestine. Br. J. Exp. Pathol. 48: 135-41, 1967.
- ENGEL, A.; KERN, W.V.; MURDTER, G e KERN, P. Kinetics and correlation with body temperature of circulating interleukin-6, interleukin-8, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1- $\beta$  in patients with the fever and neutropenia. Infection, v.22, p.160-64, 1994.
- ERICSSON, A.; KOVACS, K.J. e SAWCHENKO, P.E. A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. J. Neurosci. v. 14, p. 897-913, 1994.
- FARRAR, W.L.; KILIAU, P.L.; RUFF, M.R.; HILL, J.M.; PERT, C.B. Visualization and characterization of interleukin 1 receptor. J. Immunol., v.139, p.459-63, 1987.
- FENG, L.; XIA, Y.; GARCIA, G.E.; HWANG, D. e WILSON, C.D. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. J. Clin. Invest. v.95, p.1669-75, 1995.
- FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells? Agents and Actions, v. 10, p.229, 30, 1980.
- FLESHNER, M.; GOEHLER, L.E.; HERMANN, J.; RELTON, J.K.; MAIER, S. F. e WATKINS, L. R. Interleukin-1 $\beta$  induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. Brain Res. Bull. 37, 605-10, 1995.
- FLOWER, R.J. e DALE, M.M. The anti-inflammatory effects of corticoids. In: Textbook of Immunopharmacol. Edited by DALE, M.M.; FOREMAN, J.C.; FAN, T.P.D., P.299-308, 1994.
- FOREMAN, J.C. In Textbook of Immunopharmacol., ed. DALE, M.M.; FOREMAN, J.C.; FAN, T.P.D., P.242-51, 1994.



- FOSTER, K.D.; CONN, C.A. e KLUGER, M.J. Fever, tumor necrosis factor and interleukin-6 in young, mature and aged, Fischer 344 rats. Am. J. Physiol., v.262, p.R211-R215, 1992.
- GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. Overview. In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. (eds.) 2ed., New York, Raven Press Ltd., p.1-4, 1992.
- GATTI, S. e BARTFAI, T. Introduction of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. Brain Res., v.624, p.291-294, 1993.
- GOEHLER, L. E.; BUSCH, C. R.; TARTAGLIA, N.; RELTON, J.; SISK, D.; MAIER, S. F. e WATKINS, L. R. Blockade of cytokine induced conditioned taste aversion by subdiaphragmatic vagotomy: further evidence for vagal mediation of immune-brain communication. Neurosci. Lett. 185, p. 163-66, 1995.
- GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; MAIER, S. F. e WATKINS, L. R. Biotinylated interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) labels paraganglia in the rat liver hilus and hepatic vagus. Soc. Neurosci. Abstr. v. 20, p. 956, 1994.
- GOLD, R. M.; SAWCHENKO, P. E.; De LUCA, C.; ALEXANDER, J. e ENG, R. Vagal mediation of hypothalamic obesity but not of supermarket dietary obesity. Am. J. Physiol. v. 238, p. R447-53, 1980.
- GOLDBACH, J.M., ROTH, J. e ZEISBERGER, E. Fever suppression by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs depends on the route of pyrogen administration. Am. J. Physiol. v. 272, p. R675-81, 1997.
- GORDON, A.S. Some aspects of humoral influence upon the leukocytes. Ann. NY Acad. Sci.; n.59, p.907-27, 1955.
- GRANGER, D.N. e KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J. Leukocyte Biol., p.55-662, 1994.
- GRANT, L. The sticking and emigration of white blood cells in inflammation. In The Inflammatory Process. v.II. ZWEIFACH, B.; GRANT, L. e McCLUSKEY, R. editors. Acad. Press, New York, 205-209, 1973.
- GREEN, M.H. e VERMEULEN, C.W., Fever and the control of gram-negative bacteria. Res. Microbiol., v.145, p. 269-272, 1994.
- HANKS, J.H. e WALLACE, J.H. Determination of cell viability. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 98, p. 188-92, 1985.
- HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial interactions. Blood, v.65, p.513-9, 1985.

- HASHIMOTO, M.; ISHIKAWA, Y.; YOKOTO, S.; GOTO, F.; BANDO, T.; SAKAKIBARA, Y.; IRIKI, M. Action site of circulating interleukin 1 on the rabbit brain. Brain Res., v.540, p.217-33, 1991.
- HASHIMOTO, M.; UENO, T.; IRIKI, M. What role does the organum vasculosum laminae terminalis play in fever in rabbits? Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol., v.429, p.50-7, 1994.
- HECHTMAN, D.H.; CYBULSKY, M.I.; FUCHS, H.J.; BAKER, J.B. e GIMBRONE, M.A.Jr. Intravascular IL-8. J. Immunol., v.147, n.3, p.883-92, 1991.
- HELLE, M.; BRAKENHOFF, J.P.J.; De GROOT, E.R.; AARDEN, L.A. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. Eur. J. Immunol., v.18, p.957-9, 1988.
- HENSEL, H. neural processes in thermoregulation. Physiol. Rev., v. 53, p. 948-1017, 1973.
- HEWETT, J. A.; JEAN, P.; KUNKEL, S. L. e ROTH, R.A. Relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. Am J. Physiol., in press, 1993.
- HOFFMAN-GOETZ, L. e KLUGER, M.J. Protein deprivation: its effects on fever and plasma iron during bacterial infection in rabbits. J. Physiol. (Lond.) 295: 419-30, 1979.
- HUNTER, J. A treatise of the blood, inflammation, and Gunshot Wounds, v.1. London, J. Nicoli, 1794.
- HURLEY, J. Acute inflammation. Churchill Livingstone, Edinburgh, 157pp., 1983.
- JACOBSON, E.D. e FARRAR, W.E. Influence of route of administration on hemodynamic effects of endotoxin. Am. J. Physiol. 205: 799-802, 1963.
- JANSKY, L.; VYBIRAL, S.; POSPISILOVA, D.; ROTH, J.; DORNAND, J.; ZEISBERG, E. e KAMINKOVA, J. Production of systemic and hypothalamic cytokines during the early phase of endotoxin fever. Neuroendocrinology, v.62, p.55-61, 1995.
- KAJITA, T. e HUGLI, T.E. C5a-induced neutrophilia. Am. J. Pathol., v.137, n.2, p.467-77, 1990.
- CASTING, N.W. Criteria for establishing a physiological role for brain peptides. A case in point: the role of vasopressin in the thermoregulation during fever and antipyresis. Brain Res. Rev., v.14, p. 143-53, 1989.

- KENT, S.; BLUTHE, R.M.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. Trends Pharmacol. Sci., v.13, p. 24-28, 1992.
- KISHIMOTO, T.K.; JUTILA, M.A.; BERG, E.L.; BUTCHER, E.C. Neutrophil MAC-1 and MEL-14, adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. Science, v.245, p.1238-41, 1989.
- KISHIMOTO, T.K.; LARSON, R.S.; CORBI, A.L.; DUSTIN, M.L.; STAUNTUN, D.E.; KLIR, J.J.; ROTH, J.; SZELENYI, Z.; McCLELLAN, J.L. e KLUGER, M.J. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in LPS-fever in rat. Am. J. Physiol., v.265, p.R512-R517, 1993.
- KLIR, J. J.; ROTH, J.; SZELENYI, Z.; McCLELLAN, J. L. e KLUGER, M. J. Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in LPS-fever in rat. Am. J. Physiol. 265 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 34): R512-17, 1993.
- KLOSTERHALFEN, B; HÖRSTMANN-JUMGERMANN, K.; VOGEL, P.; FLOHÉ, S.; OFFNER, F.; KIRKPATRICK, C.J. e HEINRICH, P.C. Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. Biochem. Pharmacol., v.43, p.2103-2109, 1992.
- KLUGER, M.J. Fever and antipyresis. In: ZEISBERG, E.; SCHÖNBAUM, E. e LOMAX, P. (Eds.), Thermal Balance in Health and Disease: Recent Basic Research and Clinical Progress, Birkhäuser, Basel, p.343-352, 1994.
- KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. Physiol. Rev., v.71, p.93-127, 1991.
- KUBES, P. Polymorphonuclear leukocyte- endothelium interactions: a role for pro-inflammatory and anti-inflammatory molecules. Can. J. Physiol. Pharmacol. v. 71, p.88-97, 1993.
- LARSON, R.S. e SPRINGER, T.A. Structure and functions of leukocyte integrins. Immunol. Rev., v.144, p.181-217, 1990.
- LAWRENCE, M. B. e SPRINGER, T.A. Leukocytes roll on selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. Cell, p.65- 859, 1991.
- LAYÉ, S.; BLUNTHÉ, R.M.; KENT, S.; COMBE, C.; MÉDINA, C. PARNET, P.; KELLEY, K.; DANTZER, R. Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 $\beta$  mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. Am. J. Physiol., v.268, p.1327-31, 1995.
- LeMAY, L.G.; VANDER, A.J. e KLUGER, M.J. Role interleukin-6 in fever in rats. Am. J. Physiol. v.258, p. R798-803, 1990.

- LEY, K. Leukocyte adhesion to vascular endothelium. J Reconstr. Microsurg., v.8, p. 495-503, 1992.
- LI, S.; WANG, Y.; MATSUMARA, K.; BALLOU, L.R.; MORHAN, S.G. e BLATTEIS, C.M. The febrile response to lipopolissacharide is blocked in cyclooxygenase-2(-/-), but not in cyclooxygenase -1 (-/-) mice. Brain Res. v. 825(1-2), p. 86,94, 1999.
- LINDBOM, L.; XIE, X.; RAUD, J. e HEDQVIST, P. Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium in vivo is critically dependent on initial leukocyte rolling. Acta Physiol. Scand., v.146, p.415, 1992.
- LIPTON, J.M. e CATANIA, A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator  $\alpha$ -MSH. Immunol. Today, v. 18, p.140-48, 1997.
- LONG, N.G.; OTTERNESS, I.; KUNKEL, S.L.; VANDER, A.J. e KLUGER, M.J. Role of interleukin-6 in fever in rats. Am. J. Physiol. v. 258, p. R724-28, 1990.
- LOPEZ-VALPUESTA, F.J. e MYERS, R.D. Fever produced by interleukin-11 (IL-11) injected into the anterior hypothalamic pre-optic area of the rat is antagonized by indomethacin. Neuropharmacology , v.33, n.8, p.989-94, 1994.
- LOUIS-SYLVESTRE, J. Validation tests for completeness of vagotomy in rats. J. Auton. Nerv. Syst. v. 9, p. 301-14, 1983.
- LUHESHI, G.; MILLER, A.J.; BROUWNER, S., DASCOMBE, M.J.; ROTHWELL, N.J.; HOPKINS, S.J. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits endotoxin fever and systemic interleukin-6 induction in the rat. AM. Physiol., 270:E91-95, 1996.
- LUHESHI, G.N. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. Ann. NY Acad. Sci. v.856, p. 83-9, 1998.
- LUSTER, A.D. Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. The New England Journal of Medicine, vol. 338, n.37, p.436-45, 1998.
- MACMILLIAN, R.M. e FOSTER, S.J. Leucotriene B4 and inflammatory disease. Agents and Actions, v.24, n.1/2, p.114-9, 1988.
- MADDEN, K.S.; SANDERS, V.M. e FELTEN, D.L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. , n.35, p.417-48, 1995.
- MAIER, J. A.; VOULLAS, P.; ROEDER, D.; e MACIAG, T. Extension of the life-span human endothelial cells by na interleukin-1 alpha antisense oligomer. Science, v.249, p.1570-4, 1990.
- MARTIN, J. R.; GEISELMAN, P. J. e NOVIN, D. Drinking to intracellular dehydration following vagotomy in rats. Physiol. Behav. v. 23, p. 527-37, 1979.

- MATSUDA, T.; HORI, T. e NAKASHIMA, T. Thermal and PGE<sub>2</sub> sensitivity of the organum vasculosum laminae terminalis region and preoptic area in rat brain slices. J. Physiol. Lond., v.454, p.197-212, 1992.
- McCUSKEY, R.S.; McCUSKEY, R.A.; URBASCHEK, R e URBASCHEK, B. Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity. Infect. Im. v.45, p. 278-80, 1984.
- MILLER, A.J.; LUHESHI, G.N.; ROTHWELL, N.J. e HOPKINS, S.J. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. Am. J. Physiol. v. 272, p. R857-61, 1997.
- MILTON, A. S. Thermoregulatory actions of eicosanoids central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. Ann. N.Y. Acad. Sci., v.559, p.392-410, 1989.
- MIÑANO, F.J.; SANCIBRIAN, M.; VISZCAINO, M.; PAEZ, X.; DAVATELIS, G.; FAHEY, T.; SHERRY, B.; CERAMI, A.; MYERS, R.D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. Brain Res. Bull., v.24, p.849-52, 1990.
- MITCHELL, D. e cols. Is prostaglandin E the neural mediator of the febrile response? The case against a proven obligatory role. Yale J. Biol. Med. v. 59, p. 159-68, 1986.
- MORDES, J. P.; HERRERA, M. G. e SILEN, W. Decreased weight gain and food intake in vagotomized rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v.156, p. 257-60, 1977.
- MORIMOTO, A.; NAKAMORI, T.; WATANABE, T.; ONO, T.; MURAKAMI, N. Patter differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins. Am. J. Physiol., v.254, p.R633-40, 1988.
- MORIMOTO, A; MORIMOTO, K.; WATANABE, T.; SAKATA, Y. e MURAKAMI, N. Does an increase in prostaglandin E<sub>2</sub> in the blood circulation contribute to a febrile response in rabbits? Brain Res. Bull., v.29, p.189-192, 1992.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. v. 65, p. 55-63, 1983.
- MULLER, W. Migration of leukocytes across the vascular intima. Molecules and mechanisms. Trends Cardiovasc. Med., v.5, p.15-20, 1995.
- MURAKAMI, N. e WATANABE, T. Activation of ACTH release is mediated by the same molecule as the final mediator, PGE<sub>2</sub>, of febrile response in rats. Brain Res., v.478, p. 171-4, 1989.

- NIIJIMA, A. The afferent discharges from sensors for interleukin -1 $\beta$  in the hepato-portal system in the anaesthetized rat. J. Auton. Nerv. Syst. v.61, p. 287-91, 1996.
- OPP, M.R. e TOTH, L.A. Circadian modulation of interleukin-1 induced fever in intact and vagotomized rats. Ann. NY Acad. Sci. v.813, p. 435-6, 1997.
- PERRETI, M. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction. Elsevier Science Ltd., v. 18, p.418-25, 1997.
- PERRY, S.; WEINSTEIN, I.M.; GADDOCK, J.; LAWRENCE, J.S. The combined use of typhoid vaccine and P<sup>32</sup> labeling to assess myelopoiesis. Blood, v.12, p.549-58, 1957.
- RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. e FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. Int. J. Exp. Path., v.71, p.717-25, 1990.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q. e FERREIRA, S.H. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. Immunol., v.73, p.472-5, 1991.
- RIETCHEL, E.; KIRIKAE, T.; Ulich, S.F.; MAMAT, U.; SCHIMIDT, G.; LOOPNOW, H.; ULMER, A.J.; ZÄHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F.; SCHREIER, M. e BRADE, H. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J., v.8, p.217-25, 1994.
- ROBBINS, S. L.; COTRAN, R.S. e KUMAR, V. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 5 ed., 1996.
- ROCHA, N.P. e FERREIRA, S.H. Restoration by levamisole of endotoxin-inibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. Eur. J. Pharmacol. v. 122, p. 87-92, 1986.
- ROMANOVSKY, A. A; KULCHITSKY, V. A.; SIMONS, C. T.; SUGIMOTO, N. e SZÉKELY, V. A. Febrile responsiveness of vagotomized rats is supressed even in the absence of malnutrition. Am. J. Physiol. v. 273, p. R777-83, 1997b.
- ROMANOVSKY, A. A; KULCHITSKY, V. A.; SIMONS, C. T.; SUGIMOTO, N. e SZÉKELY, V. A. Cold defense mechanisms in vagotomized rats. Am. J. Physiol. v. 273, p. R784-89, 1997a.
- ROTH, J.; CONN, C.A; KLUGER, M.J. e ZEISBERGER, E. Kinetics of systemic and intrahypothalamic IL-6 and tumor necrosis factor during endotoxin fever in guinea pigs. Am. J. Physiol. v. 265, p. R653-58, 1993.

- ROTH, J.; Putative pathways for fever induction in response to systemic or localised formation of cytokines. Em: Cytokines in the defense responses. Anais da XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, p. 456, 1999.
- ROTHWELL, N. J.; HARDWICK, A.J. e LINDLEY, I. Central actions of interleukin-8 in the rat are independent on prostaglandins. Horm. Metab. Res., v.22, p.595-96, 1990a.
- ROTHWELL, N.J. Central action of thermogenesis by prostaglandins: dependence on CRF. Horm. Metab. Res., v.22, p.616-18, 1990.
- ROTHWELL, N.J. e HOPKINS, S.J. Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. Trends Neurosci., v. 18, p.130-36, 1995.
- ROTHWELL, N.J.; BUSBRIDGE, N.J.; LEFEUVRE, R. A.; HARDWICK, A. J.; GAULDIE, J. e HOPKINS, S.J. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. Can. J. Physiol. Pharmacol., v. 69, p. 1465-69, 1991.
- RUBEN, J. The evolution of endothermy in mammals and birds: from physiology to fossils. Annu. Ver. Physiol., v. 57, p. 69-95, 1995.
- RUSSO, M. The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes to bacteria lipopolysaccharides. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. v. 134, p. 326-30, 1980.
- SAWCHENKO, P.E. e GOLD, R.M. Effects of gastric vs complete subdiaphragmatic vagotomy on hypothalamic hyperalgesia and obesity. Physiol. Behav. v. 26, p. 281-292, 1981.
- SAWCHENKO, P.E.; GOLD, R.M. e ALEXANDER, J. Effects of selective vagotomies on knife cut-induced hypothalamic obesity: differential results on lab-chow vs. High-fat diets. Physiol. Behav. v. 26, p. 293-300, 1981a.
- SCAMMELL, T. E.; GRIFFIN, J. D.; ELMQUIST, J.K. e SAPER, C. B. Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever. Am. J. Physiol. v.274, p. R933-35, 1998.
- SCHÖBITZ, B.; De KLOET, E.R.; SUTANTO, W. e HOLLSBOER, F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. Eur. J. Neurosci., v.5, p. 1426-35, 1993.
- SEHIC, E. e BLATTEIS, C. M. Blockade of lipopolysaccharide-induced fever by subdiaphragmatic vagotomy in guinea pigs. Brain Res. v. 726, p. 160-66, 1996.
- SEHIC, E.; HUNTER, W. S.; UNGAR, A. L. e BLATTEIS, C. M. Blockade of Kupffer cells prevent the febrile and preoptic prostaglandin E<sub>2</sub> response to intravenous lipopolysaccharide in guinea pigs. Ann. NY Acad. Sci. v.813, p. 448-52, 1997.

- SHAPIRO, L.; ZHANG, X.; RUPP, R.G.; WOLFF, S.M.; DINARELLO, C.A. Ciliary neurotrophic factor is an endogenous pyrogen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.90, p.8614-8, 1993.
- SHIDO, O., NAGASAKA, T. e WATANABE, T. Blunted febrile response to intravenous endotoxin in starved rats. J. Appl. Physiol. v.67, p. 963-69, 1989.
- SIRKO, S.; BISHAI, I. e COCCEANI, F. Prostaglandin formation in the hypothalamus in vivo: effect of pyrogens. Am. J. Physiol. v. 256, p. R616-24, 1989.
- SMITH, W.B.; GAMBLE, J. R.; CLARK-LEWIS, I. e VADAS, M.A. Interleukin-8 induces neutrophil transendotelial migration. Immunol., v.72, p.65-72, 1991.
- SOUZA, G.E.P. e FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophil into the inflamed peritoneal cavity. Agents and Actions, v.17, p.97-103, 1985.
- SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Resident macrophages control initial migration in the acute inflammatory response. Em: Inflammatory mediators. Iuphar 9<sup>th</sup> International Congress of Pharmacology, Higgs, G. A. e Willians, T. D. (eds.), p. 149-56, 1985.
- SPRINGER, T.A. Leukocyte integrins. In: Leukocyte adhesion molecules: structure, function and regulation. SPRINGER, T.A.; ANDERSON, D.C.; ROSENTHAL, A.S.; ROTHLEIN, R. (eds.), New York, Springer Verlag, p.7-43, 1989.
- SPRINGER, T.A. Traffic signals of lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell, p.76-301, 1994.
- STADNYK, A.W. e GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. Parasitology Today, v.7, p.A7-A12, 1991.
- STERFFEL, A.; HOPKINS, S.J. e ROTHWELL, N.J. The role of TNF- $\alpha$  in fever: opposing actions of human and murine TNF- $\alpha$  and interation with IL-1 $\beta$  in the rat. J. Pharmacol., v.118, p.1919-24, 1996.
- STITT, J. T. Evidence for the involvement of the organum vasculosum laminae terminalis in the febrile response of rabbits and rats. J. Physiol. Lond. 368: 501-11, 1985.
- SUNDGREN-ANDERSSON, A. K.; ÖSTLUND P. e BARTFAI, TAMAS. IL-6 is essencial in TNF- $\alpha$ -induced fever. Am. J. Physiol. v. 275, p. R2028-34, 1998.
- SZÉKELY, M. e SZELÉNYI, Z. The pathophysiolgy of fever in the neonate. In: *Handbook of Experimental Pharmacology. Pyretics and Antipitretics*, edited by A. S. Milton. Berlin: Springer, v. 60, p. 479-528, 1982.



- TADA, H.; SHIMO, O.; KUROSHIMA, K.I. e TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin-2. J. Immunol. Meth. v. 93, p. 157-65, 1986.
- TAKAO, T.; TRACEY, D.E.; MITCHELL, W.M. e De SOUZA, E.B. Interleukin-1 receptor in the mouse brain: characterization and neuronal localization. Endocrinology, v.127, p.3070-78, 1990.
- ULICH, T.R.; CASTILLO, J.; GUO, K. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. Blood, v.73, n.1, p.108-11, 1989.
- ULICH, T.R.; CASTILLO, J.; KEYS, M.; GRANGER, G.A. Recombinant human alpha lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) induces peripheral neutrophilia and lymphopenia in the rat. Am. J. Pathol., v.128, n.1, p.5-12, 1987.
- ULICH, T.R.; CASTILLO, J.; KEYS, M.; GRANGER, G.A.; NI, R.-X. Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin 1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced changes in circulating numbers of neutrophil and lymphocytes. J. Immunol., v.139, n.10, p.3406-15, 1987a.
- ULICH, T.R.; CASTILLO, J.; NI, R.X.; BIKHAZI, N. Hematologic interactions of endotoxin, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 and adrenal hormones and hematologic effects of TNF- $\alpha$  in *Corynebacterium parvum*-primed rats. J. Leukoc. Biol., v.45, p.546-57, 1989a.
- ULICH, T.R.; DAKAY, E.B.; WILLIAMS, J.H.; NI, R.-X. IN vivo induction of neutrophilic lymphopenia, and diminution of neutrophil adhesion by stable analogs of prostaglandins E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> and F<sub>2 $\alpha$</sub> . Am. J. Pathol., v.124, p.53-8, 1986.
- USHIKUBI, F. e cols. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub>. Nature, v. 395, p.281-84, 1998.
- Van der POOL, T.; van der DEVENTER, S.J.H.; HACK, C.E.; WOLBINK, G.J.; AARDEN, L.A; BÜLLER, H.R. e CATE, J.W. Effects on leukocytes after injection of tumor necrosis factor into healthy humans. Blood, v.79, p.693-98, 1992.
- VON ADRIAN, U. H.; CHAMBERS, J. D.; McEVOY, L. M.; BARGATZE, R. F.; ARFORS, K. E. e BUTCHER, E.C. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte  $\beta_2$  integrins in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, p.88-7538, 1991.
- WAN, W.; WESTMORE, L.; SORENSEN, C.M.; GREENBERG, A. H. e NANCE, D.M. Neural and biochemical mediators of endotoxin- and stress-induced *c-fos* expression in the rat brain. Brain Res. Bull. v. 34, p. 7-15, 1994.

- WATKINS, L.R.; GOELHER, L.E.; RELTON, J.K.; TARTAGLIA, N.; SILBERT, L.; MARTIN, D.; MAIER, S.F. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication, Neurosci. Lett. v.183, p. 22-31, 1995a.
- WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. Pain, v.63, p.289-302, 1995b.
- WATKINS, L.R.; WIERTELAK, E.P.; GOEHLER, L.E.; SMITH, K.P.; MARTIN, D. e MAIER, S.F. Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. Brain Res. v.654, p.15-26, 1994.
- WILKINSON, P.C. Cellular accumulation and inflammation. In: Textbook of Immunopharmacology. DALE, M.M.; FOREMAN, J.C.; FAN, D (eds.), 3ed., Oxford, Blackwell Scientific Publication, cap.19, p.218-31, 1994.
- YANCEY, K.B. Biological properties of human C5a: selected "in vitro" and "in vivo" studies. Clin. Exp. Immunol., v.71, p.207-10, 1988.
- ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G.E.P.; SILVA, C.A.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent, mechanism. Am. J. Physiol., v.266, p.R1670-4, 1994.
- ZAMPRONIO, A.R. Evidências de um novo fator pirogênico pré-formado em macrófagos. Tese de doutorado, 1998.
- ZAMPRONIO, A.R.; MELO, M.C.C.; SILVA, C.A.A.; PELÁ, I.R.; HOPKINS, S.J. e SOUZA, G.E.P. A pre-formed pyrogenic factor released by lipopolyssacharide stimulated macrophages. Med. of Inflamm. v. 3, p. 365-73, 1994 a.
- ZHOU, Z.Z. e JONES, S.B. Involvement of central vs. peripheral mechanisms in mediating sympathoadrenal activation in endotoxic rats. Am. J. Physiol., v.265, p.683-8, 1993.